

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation⁵ : C12N 15/67, 15/52, 15/70 C12N 1/21, C12P 17/18 C12N 1/21, C12R 1/19, 1/01	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/08023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. April 1994 (14.04.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02688 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Oktober 1993 (01.10.93) (30) Prioritätsdaten: 3124/92 2. Oktober 1992 (02.10.92) CH 2134/93 15. Juli 1993 (15.07.93) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; Gampel/Wallis, Münchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIRCH, Olwen [GB/CH]; Dammweg 11D, CH-3904 Naters (CH). BRASS, Johann [DE/CH]; In den Schatmatten, CH-3938 Ausserberg (CH). FUHRMANN, Martin [DE/CH]; Litternaweg 9, CH-3930 Visp (CH). SHAW, Nicholas [GB/CH]; Weingartenweg 14, CH-3930 Visp (CH).		(74) Anwälte: WEINHOLD, Peter; Siegfriedstrasse 8, D-80803 München (DE) usw. (81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF PRODUCING BIOTIN

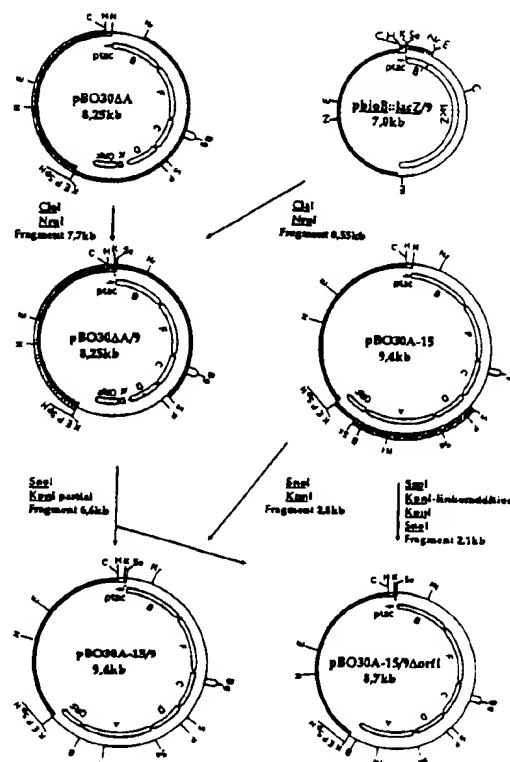
(54) Bezeichnung: BIOTECHNOLOGISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN

(57) Abstract

The invention pertains to DNA fragments and plasmids comprising the *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* and *bioA* genes responsible for biosynthesis of biotin, or their functionally equivalent genetic variants and mutants from enteric bacteria, wherein the genes are arranged in a transcription unit. The invention also pertains to microorganisms that contain these DNA fragments and plasmids and a method of producing biotin using these microorganisms.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft DNA-Fragmente und Plasmide, umfassend die Gene der Biotin-Biosynthese *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* und *bioA* oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien, worin die Gene in einer Transkriptionseinheit angeordnet sind. Die Erfindung betrifft ferner Mikroorganismen, die diese DNA-Fragmente und Plasmide enthalten, und ein Verfahren zur Herstellung von Biotin unter Verwendung dieser Mikroorganismen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

BIOTECHNOLOGISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN

Die Erfindung betrifft rekombinantes genetisches Material zur Expression der Gene des Biotin-Stoffwechselwegs von Enterobakterien, Mikroorganismen, die dieses rekombinante genetische Material enthalten, und die Verwendung solcher Mikroorganismen in einem biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von Biotin. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Biotin, das die Umsetzung von Dethiobiotin mittels Biotinsynthase im zellfreien System umfaßt.

Biotin (Vitamin H) ist ein für Mensch und Tier wichtiges Vitamin, dessen Mangel beispielsweise Seborrhoe, Dermatitis, Appetitlosigkeit und Müdigkeit hervorrufen kann. Dementsprechend ist Biotin ein nützlicher Zusatzstoff für Lebens- und Futtermittel.

Die Herstellung von Biotin mit Methoden der synthetischen organischen Chemie ist aufwendig und kostspielig. Aus diesem Grunde finden biotechnologische Verfahren, in denen Biotin mit Hilfe von Mikroorganismen aus billigen Ausgangsmaterialien wie Glucose synthetisiert werden kann, zunehmend Beachtung.

Escherichia coli (E. coli) ist ein Mikroorganismus, der in der Lage ist, ausgehend von einfachen Kohlenstoffquellen wie Glycerin oder Glucose Biotin zu synthetisieren (Fig. 1). Die Gene, die für die Biosynthese von Biotin in E. coli verantwortlich sind, liegen in einem Operon vor, das bereits kloniert wurde und die fünf Gene bioA, bioB, bioC, bioD und bioF (im folgenden auch als bio-Gene bezeichnet) umfaßt (Gupta et al., Gene 1:331-345; 1977). Diese Gene werden von einer Promotor-Operator-Region, die sich zwischen den Genen bioA und bioB befindet, in zwei verschiedene Richtungen transkribiert. Bezüglich der konventionellen Genkarte liegen die Gene bioB, bioF, bioC und bioD rechts und das Gen bioA links von der Promotor-Operator-Region. Die DNA links der Promotor-Operator-Region umfaßt stromabwärts des bioA-Gens ein weiteres Gen mit

der Bezeichnung ORFI (ORF = open reading frame), das für ein Polypeptid mit 158 Aminosäuren codiert und zusammen mit dem bioA-Gen transkribiert wird (Otsuka et al., J. Biol. Chem., 263:19577-19585; 1988). Die Funktion dieses Gens ist bislang
5 unbekannt. Andere Stämme aus der Familie der Enterobakterien, beispielsweise der Gattung Salmonella oder Citrobacter, weisen einen zu E. coli analogen Aufbau des Biotin-Operons auf (Shiu-an und Campbell, Gene 67:203-211; 1988).

10 Es sind bereits biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Biotin bekannt, die mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die mit dem klonierten Biotin-Operon von E. coli transformiert sind. Diese Verfahren werden ausgehend von Glucose durchgeführt. Die EP-B-236 429 beschreibt beispielsweise
15 Mikroorganismen, die mit dem Biotin-Operon von E. coli transformiert sind, wobei die Wirtsorganismen in ihrem birA/bioR-Gen mutiert sind.

In der EP-A-316 229 werden E. coli-Mutanten beschrieben, die
20 weniger Acetat produzieren und ebenfalls mit dem klonierten Biotin-Operon transformiert wurden.

Die EP-A-449 724 offenbart mit dem Biotin-Operon transformierte Mikroorganismen, die zusätzlich Mutationen aufweisen, die
25 einen geringeren Glucoseverbrauch zur Folge haben.

Aus der EP-A-266 240 ist ferner die Klonierung der für die Biotin-Synthese in Bacillus sphaericus verantwortlichen Gene und ein darauf aufbauendes Verfahren zur Herstellung von Biotin bekannt. Bedingt durch den Metabolismus von Bacillus sphaericus muß dieses Verfahren ausgehend von kostspieliger
30 Pimelinsäure durchgeführt werden.

Die Ausbeuten, die nach den bislang bekannten biotechnologischen Verfahren erhalten werden, sind jedoch unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bislang nicht zufriedenstellend.
35

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Biotin bereitzustellen, das höhere Ausbeuten an Biotin ermöglicht und damit wirtschaftlicher ist.

5

Diese Aufgabe wurde unter Verwendung von DNA-Fragmenten und Vektoren gelöst, die die Gene bioB, bioF, bioC, bioD und bioA oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien umfassen, wobei diese Gene in einer Transkriptionseinheit organisiert sind.

10

Unter Transkriptionseinheit wird hierbei eine DNA-Sequenz verstanden, in der die Gene in einer Transkriptionsrichtung angeordnet sind und unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle in ein durchgehendes Transkript überschrieben werden, wobei die DNA-Sequenz neben den jeweiligen Genen auch die für die Genexpression erforderlichen genetischen Kontrollelemente wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen umfaßt.

15

Unter "funktionell äquivalenten genetischen Varianten und Mutanten" werden Gene verstanden, die sich von den Wildtyp-Genen der Ursprungsorganismen, d. h. der Enterobakterien, ableiten und Basenaustausche im Rahmen der bekannten Degeneration des genetischen Codes aufweisen. Derartige Basenaustausche können natürlichen Ursprungs oder künstlich erzeugt sein, beispielsweise um die Gensequenz an die bevorzugte Codon-Verwendung eines bestimmten Mikroorganismus, in dem eine Expression erfolgen soll, anzupassen. Die genetischen Varianten und Mutanten umfassen ferner Deletionen, Insertionen und Substitutionen von Basen oder Codons, die das Genprodukt einer derart veränderten Sequenz in seiner Funktion grundsätzlich intakt lassen. Umfaßt sind insbesondere Sequenzen, die unter den üblichen Hybridisierungsbedingungen, d.h. bei Temperaturen zwischen 55 und 66°C und bei 0,03 bis 0,3M Salzanteil, mit den Wildtyp-Sequenzen hybridisieren, also Sequenzen, die zu den Wildtyp-Sequenzen eine hohe Homologie, beispielsweise höher als 70%, aufweisen.

20

25

30

35

Fig. 1 zeigt die Enzyme des Stoffwechselwegs der Biotin-Biosynthese.

Fig. 2 zeigt das Konstruktionsschema für das Plasmid pBO30.

5

Fig. 3 zeigt die DNA-Sequenz der Plasmide pBO30, pBO30A-9 und pBO30A-15 für den Bereich des 3'-Endes des bioD-Gens und des 5'-Endes des bioA-Gens (durchbrochene Pfeile; das bioA-Startcodon ist unterstrichen, das bioD-Stopcodon punktiert dargestellt) zusammen mit den für die Plasmidkonstruktion relevanten Restriktionsschnittstellen und der Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz des bioA-Gens. Potentielle "stem-loop"-Strukturen sind mit durchgehenden Pfeilen gekennzeichnet.

10

15

20

25

Fig. 4 zeigt die Schritte zur Variation der Sequenz stromaufwärts des bioB-Gens ausgehend von Plasmid p_{bioB}::lacZ-2 zur Konstruktion verbesserter Ribosomenbindungsstellen unter Angabe der benutzten Restriktionsschnittstellen, der jeweiligen Shine-Dalgarno-Sequenzen (SD) und des bioB-Startcodons (Met). Dargestellt sind die Sequenzen stromaufwärts des bioB-Gens und der 5'-Terminus des bioB-Gens. Die gestrichelten Linien kennzeichnen das inserierte Oligonukleotid 985E. Durchgestrichene Nukleotide sollten nach der Theorie vorhanden sein, fehlen aber in Plasmid p_{bioB}::lacZ/985E und den davon abgeleiteten Plasmiden p_{bioB}::lacZ/9 und p_{bioB}::lacZ/16, was den Verlust einer BamHI-Stelle (BamHI) zur Folge hat. "fill-in": Auffüllen mit Klenow-Polymerase.

30

Fig. 5 zeigt das Konstruktionsschema für die Plasmide pBO30A-15/9 und pBO30A-15/9 Δ orfI.

35

Fig. 6 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz der in Plasmid pBO30A-15/9 für die Biotin-Biosynthese codierenden Gene zusammen mit den genetischen Kontrollelementen (SD: Shine-Dalgarno-Sequenz). Kursiv dargestellte Aminosäuren am COOH-Terminus des bioD15-Gens stellen Substitutionen gegenüber der Wildtyp-Sequenz des bioD-Gens von E. coli dar.

Fig. 7 zeigt das Konstruktionsschema für Plasmid pB074ΔB ausgehend von den Plasmiden pB074-13 und pB03; Pfeile geben die Lage und die Orientierung des tac-Promotors und der bio-Gene an. Der Vektoranteil der Plasmide ist fett dargestellt. Durchbrochene Linien geben den Umfang der Deletion des bioB-Gens wieder.

In den Fig. 2 und 5 bedeuten A: AatII; B: BamHI; Bg: BglII; C: ClaI E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; N: NcoI; Nr: NruI; P: PstI; S: SnoI; Sa: SalI; Se: SseI; Sp: SphI; Ss: SspI; und X: XbaI. "fill-in": Auffüllen rezessiver 3'-Enden mit Klenow-Polymerase; mbn: Entfernen überhängender 5'- oder 3'-Enden mit "Mung Bean Nuclease; Bal31: progressive Deletion von DNA mit Exonuklease Bal31. Der Vektoranteil der Plasmide ist fett dargestellt. Die unterschiedlich schraffierten Teile in den Plasmiden wurden jeweils für den nachfolgenden Klonierungsschritt verwendet. Pfeile geben die Lage und die Orientierung der bio-Gene an.

Zur Konstruktion der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und Vektoren werden die Gene des Biotin-Operons zunächst zweckmäßig aus dem Chromosom eines geeigneten Mikroorganismus isoliert und anschließend unter der Kontrolle genregulatorischer Elemente wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen so miteinander verknüpft, daß sie organisiert in einer einzigen Transkriptionseinheit vorliegen. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der bio-Gene können Bakterienstämme aus der Familie der Enterobakterien dienen, beispielsweise der Gattung Escherichia, Salmonella oder Citrobacter. Zweckmäßig ist das Ausgangsmaterial ein Mikroorganismus der Spezies Escherichia coli, die am besten charakterisiert ist.

Die Konstruktion der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente und Vektoren kann beispielsweise ausgehend von einer Genbank eines geeigneten Mikroorganismus wie E. coli erfolgen, aus der die bio-Gene oder Fragmente davon durch Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden, die Teilsequenzen der bio-Gene ent-

halten, in bekannter Weise isoliert und kloniert werden können. Anschließend werden die isolierten und klonierten bio-Gene mit den bekannten Methoden der DNA-Rekombination unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors so miteinander verknüpft, daß sie als eine einzige Transkriptionseinheit vorliegen. Zweckmäßig erfolgt die Anordnung der bio-Gene derart, daß das bioA-Gen stromabwärts der Gene bioB, bioF, bioC und bioD liegt, die im Wildtyp-Operon von E. coli bereits in einer Transkriptionseinheit vorliegen. Das bioB-Gen kodiert mit der Biotinsynthese das Schlüsselenzym des gesamten Biotin-Synthesewegs, da die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin durch Biotinsynthese bislang den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des fünfstufigen Biotin-Synthesewegs darstellt. Das bioB-Gen ist daher zweckmäßig das erste Gen innerhalb der Transkriptionseinheit, da dann wegen der Nähe zum Promotor eine optimale Expression dieses Gens erfolgen kann (Fig. 2, 4, 5 und 6).

Die zweite Transkriptionseinheit im Wildtyp-Biotin-Operon von E. coli, die das bioA-Gen enthält, umfaßt außerdem ein weiteres Gen, ORFI, das für ein Polypeptid mit 158 Aminosäuren kodiert. Versuche, die mit Expressionsplasmiden durchgeführt wurden, in denen kein ORFI-Gen anwesend ist, zeigen, daß dieses Gen unter den üblichen Fermentationsbedingungen für die Biotin-Biosynthese nicht essentiell ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß diesem in seiner Funktion bislang unbekannten Polypeptid unter bestimmten Bedingungen auch eine Rolle bei der Biotin-Synthese zukommt. Obwohl die Anwesenheit des ORFI-Gens in den erfindungsgemäßen DNA-Fragmenten also nicht zwingend notwendig ist, umfaßt die Transkriptionseinheit mit den bio-Genen in einer zweckmäßigen Ausführungsform zusätzlich auch das ORFI-Gen. (Fig. 2, 5 und 6).

In den erfindungsgemäßen DNA-Fragmenten und Vektoren stehen die bio-Gene vorteilhaft nicht unter der Kontrolle des natürlichen Biotin-Promotors von E. coli. Vielmehr werden die bio-Gene zur Verbesserung der Transkription zweckmäßig unter die

Kontrolle eines starken Fremdpromotors gestellt. Die Wahl des Promotors hängt von den gewünschten Expressionsbedingungen ab, beispielsweise davon, ob eine konstitutive oder induzierte Expression gewünscht wird, oder von dem Mikroorganismus, in dem die Expression erfolgen soll. Geeignete Promotoren sind beispielsweise die Promotoren P_L und P_R des Phagen Lambda (vgl. Schauder et al., Gene 52:279-283; 1987), der Promotor pxylS des TOL-Plasmids von Pseudomonas putida mit dem benachbarten Regulatorgen xylR (Franklin et al., J. Bacteriol. 154:676-685; 1983), der trc-Promotor (Amann et al., Gene 69:301-315; 1988), der trp-Promotor (Amann et al., Gene 25:167-178; 1983), der Promotor pdegQ aus Bacillus subtilis, der in der Stationärphase aktiv ist (Dahl et al., J. Bacteriol. 173:1539-1547; 1991) und der lacUV5-Promotor (Amann et al., Gene 25:167-178; 1983). Bevorzugt wird als Promotor der tac-Promotor gewählt, ein Hybrid aus dem trp- und dem lacUV5-Promotor von E. coli, der als konstitutiver oder induzierbarer Promotor eingesetzt werden kann (Russell und Bennett, Gene 20:231-243; 1982).

Es wurde außerdem gefunden, daß die Expression des bioA-Gens in der oben beschriebenen bevorzugten Anordnung weiter verbessert werden kann, wenn der Abstand zwischen den in der Transkriptionseinheit aufeinanderfolgenden Genen bioD und bioA möglichst kurz ist, d. h. vorzugsweise weniger als 50bp (Basenpaare) beträgt. Überraschend wurde festgestellt, daß die Expression besonders hoch ist, wenn die Sequenz des 3'-Endes des bioD-Gens, die für den COOH-Terminus der Dethiobiotin (DTB)-Synthetase kodiert, gleichzeitig die Ribosomenbindungsstelle des nachfolgenden bioA-Gens beinhaltet. Vorteilhaft liegt gleichzeitig eine Überlappung der Leseraster der Gene bioD und bioA vor. Eine derartige Konstellation läßt sich erreichen, wenn man das 5'-Ende des bioA-Gens zusammen mit dessen Ribosomenbindungsstelle so mit dem bioD-Gen fusioniert, daß dessen 3'-Ende durch die Sequenz mit der Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des bioA-Gens und, gegebenenfalls,

den 5'-Terminus des bioA-Gens substituiert wird (Fig. 3 und 6; Seq ID No: 1, 6 und 8-16). Dieser Effekt ist umso überraschender, als bei einer derartigen Fusion der COOH-Terminus der DTB-Synthetase ausgetauscht werden kann, ohne daß das Enzym seine Aktivität verliert. Ähnliche Überlappungen finden sich auch im Wildtyp-Biotin-Operon von E. coli zwischen den Leserastern der Gene bioB, bioF, bioC und bioD.

Die Expression des bioB-Gens läßt sich durch Optimierung der Ribosomenbindungsstelle vor dem bioB-Gen weiter optimieren. Zweckmäßig geht man hierbei von einem Konstrukt aus, in dem das bioB-Gen bereits unter der Kontrolle eines starken Promotors, z.B. des tac-Promotors, steht. Die Optimierung der Ribosomenbindungsstelle des bioB-Gens, d.h. die Variation der Shine-Dalgarno-Sequenz und deren Abstand zum 5'-Ende des Strukturgens, kann mittels der üblichen Methoden der DNA-Rekombination erfolgen. Der Einfluß einer bestimmten Ribosomenbindungsstelle auf die Translation kann in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Genfusion des zu testenden Gens mit dem lacZ-Gen und anschließendem Test mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), bestimmt werden.

DNA-Fragmente, die die bio-Gene in einer Transkriptionseinheit umfassen, können mit Hilfe der bekannten Techniken der DNA-Rekombination in eine Vielzahl von Vektoren eingebaut werden. Auf diese Weise wurden beispielsweise die Plasmide pBO30A-15/9 (Fig. 5 und 6, Seq ID No: 1 und 6; Beispiel 1.5.2) und pBO47 (Beispiel 1.7) erhalten. Plasmid pBO30A-15/9 wurde am 28. 9. 1992 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-3300 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, in E. coli XL1-Blue und E. coli BM4062 unter den Hinterlegungsnummern DSM 7246 bzw. 7247, und am 17. 9. 1993 in E. coli ED8767 unter der Hinterlegungsnummer DSM 8554 hinterlegt. Plasmid pBO47 wurde am 17. 9. 1993 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Agrobacterium/

Rhizobium sp HK4 unter der Hinterlegungsnummer DSM 8555 hinterlegt.

5 Abhängig von der Art der gewählten Vektoren können die Gene für die Enzyme des Biotin-Synthesewegs in verschiedenen Organismen exprimiert werden. Als Vektoren eignen sich sowohl Vektoren mit spezifischem Wirtsspektrum als auch Vektoren mit breitem Wirtsspektrum ("broad hoast range"). Beispiele für Vektoren mit spezifischem Wirtsspektrum, z.B. für E. coli,
10 sind pBR322 (Bolivar et al., Gene 2:95-113; 1977), pUC18/19 (Yanisch-Perron et al., Gene 33:103-119; 1985), pK18/19 (Pridmore, Gene 56:309-312; 1987) und pRA95 (erhältlich von Nycomed Pharma AS, Hvidovre, Dänemark).

15 Als "broad hoast range" Vektoren können alle Vektoren eingesetzt werden, die für Gram-negative Bakterien geeignet sind. Beispiele für solche "broad hoast range" Vektoren sind pRK290 (Ditta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351; 1980), pKT240 (Bagdasarian et al., Gene 26:273-282; 1983), Derivate
20 von pRK290 wie pLAFR1 (Long et al., Nature 298:485-488; 1982) und pRK290X (Alvarez-Morales et al., Nucl. Acid. Res. 14:4207-4227; 1986), Derivate von pKT240 wie pMMB66EH (Fürste et al., Gene 48:119-131; 1986) oder pGSS33 (Sharpe, Gene 29:93-102; 1984).

25 Zur Herstellung der Produktionsstämme für die Fermentation, d. h. der Stämme für die Biotin-Produktion, muß das erfindungsgemäße DNA-Fragment in die gewünschten und zur Expression geeigneten Wirtsstämme eingebracht werden. Mikroorganismen,
30 die zur Expression der bio-Gene geeignet sind, vorzugsweise Stämme mit weitem Substratspektrum, sind beispielsweise Enterobakterien, vorzugsweise der Gattung Escherichia, oder Mikroorganismen der Gattung Rhizobium, Agrobacterium, Rhizobium / Agrobacterium, Acinetobacter, Azotobacter, Pseudomonas und
35 Comamonas. Besonders bevorzugt sind Mikroorganismen der Spezies E. coli, Rhizobium / Agrobacterium sp. HK4 (wie beschrieben in der EP-B 158 194), Pseudomonas mendocina, Pseudomonas

aeruginosa oder Acinetobacter calcoaceticus. Die Mikroorganismen können das erfindungsgemäße DNA-Fragment entweder auf einem Vektormolekül oder integriert in ihrem Chromosom enthalten. Das Einbringen des DNA-Fragments in die Mikroorganismen kann beispielsweise durch Transformation oder Konjugation erfolgen. Zweckmäßig werden die ausgewählten Mikroorganismen in an sich bekannter Weise mit Vektoren transformiert, die die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente enthalten. Geeignete Produktionsstämme sind beispielsweise E. coli XL1-Blue, E. coli BM4062 und E. coli ED8767, jeweils enthaltend Plasmid pBO30A-15/9 (DSM 7246, DSM 7247 und DSM 8554) und Agrobacterium/Rhizobium sp HK4 mit Plasmid pBO47 (DSM 8555).

Die Isolierung der transformierten Wirtsstämme erfolgt zweckmäßig aus einem selektiven Nährmedium, dem ein Antibiotikum zugesetzt wird, gegen das die Wirtsstämme durch ein auf dem Vektor oder DNA-Fragment befindliches Markergen resistent sind.

Die biotechnologische Herstellung von Biotin erfolgt unter Verwendung der Mikroorganismen, die die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente oder Vektoren enthalten. Das Verfahren zur Herstellung von Biotin erfolgt in üblicher Weise in Kulturen ausgehend von einer als Wachstumssubstrat für den jeweiligen Mikroorganismus geeigneten Kohlenstoffquelle, die schließlich in Biotin umgewandelt wird. Als Kohlenstoffquelle geeignet sind insbesondere einfache Zuckermoleküle, beispielsweise Glucose, oder Glycerin. Dementsprechend können als Wachstumsmedien handelsübliche Medien wie beispielsweise Nutrient Yeast Broth (NYB: Nutrient Broth No. 2, Oxoid, 25g/l; Hefe-Extrakt, Oxoid, 5g/l) oder Glycerin- und Glucose-Minimalmedien verwendet werden.

Bevorzugt erfolgt die Fermentation, d.h., die Herstellung von Biotin, als sog. "fed-batch-Verfahren", d.h., in einer Batch-Fermentation, der kontinuierlich oder in Intervallen ein Volumenstrom mit frischen Nährstoffen zugeführt wird, wobei jedoch

keine Kulturlösung abgezogen wird. In einem solchen Verfahren wird als "feed" vorzugsweise eine Glycerinlösung mit variabler, der jeweiligen Biomasseentwicklung angepaßter Zuflußrate zugeführt.

5

Die Fermentation erfolgt innerhalb der für die jeweiligen Mikroorganismen physiologisch verträglichen pH- und Temperaturbereiche. Zweckmäßig liegt der pH-Wert innerhalb eines Bereichs von 6 bis 8 und die Temperatur innerhalb eines Bereichs von 20 bis 45°C.

10

Durch Variation der Nährstoffe im Medium und durch Anpassung der Fermentationsbedingungen an den jeweiligen Mikroorganismus in üblicher Weise kann die Ausbeute an Biotin weiter verbessert werden.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von Biotin, das die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin im zellfreien System mittels des Enzyms Biotinsynthase umfaßt, worin die Umsetzung in Gegenwart von Thiaminpyrophosphat, NADPH, S-Adenosylmethionin, Fe^{2+} -ionen, Cystein und wenigstens einer weiteren Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin durchgeführt wird.

20

Die Biotinsynthase kann entweder in aufgereinigter Form oder in Form eines Zellextrakts eingesetzt werden. Zweckmäßig wird der Zellextrakt oder die aufgereinigte Biotinsynthase aus einem Stamm mit erhöhter Expression der Biotinsynthase gewonnen, beispielsweise aus E. coli XL1-Blue mit dem Plasmid pBO30A-15/9 (DSM 7246). Die Herstellung des Zellextrakts und gegebenenfalls die Aufreinigung der Biotinsynthase können nach den in der Biochemie üblichen Methoden, beispielsweise durch Homogenisieren der Zellen, Gelfiltration, Ammoniumsulfat-Fraktionierung und Ionenaustausch-Chromatographie, erfolgen.

25

30

35

Es wurde gefunden, daß sich die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin im zellfreien System mittels Biotinsynthase nur dann mit guten Ausbeuten durchführen läßt, wenn die Umsetzung unter Zugabe von Cofaktoren und Aminosäuren erfolgt.

5

Die für die Umsetzung erforderlichen Cofaktoren umfassen S-Adenosylmethionin (SAM), Thiaminpyrophosphat (TPP), reduziertes Nikotinsäureamidadenindinukleotiddiphosphat (NADPH) und Fe^{2+} -Ionen. Die Cofaktoren werden zweckmäßig in Konzentrationen von 1 bis $500\mu\text{M}$ zugegeben. Zweckmäßig wird der Mischung auch Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 0,1 bis 10mM zugegeben

10

Aminosäuren, die für die Umsetzung erforderlich sind, sind Cystein als Schwefeldonor und wenigstens eine weitere Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin. Asparaginsäure wird zweckmäßig als Aspartat zugegeben. Cystein wird zweckmäßig in Konzentrationen von 10 bis $500\mu\text{M}$, die weiteren Aminosäuren in Konzentrationen von 1 bis 50 mM zugegeben.

15

20

Es wurde weiter gefunden, daß die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin bei Verwendung einer gereinigten Biotinsynthase nur in Gegenwart von Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)- NADP^{+} -Reduktase erfolgt. Zweckmäßig werden daher zur Umsetzung, insbesondere wenn die Biotinsynthase nicht in Form eines Zell-extrakts eingesetzt wird, Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)- NADP^{+} -Reduktase zugesetzt. Flavodoxin und Ferredoxin (Flavodoxin)- NADP^{+} -Reduktase (EC-Nr. 1.18.1.2) sind bekannte Proteine, die sich in bekannter Weise, beispielsweise durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltrationschromatographie, unabhängig von der Expression der Biotinsynthase aus Zellextrakten von E. coli erhalten lassen. So konnten Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)- NADP^{+} -Reduktase beispielsweise sowohl aus E. coli XL1-Blue mit dem Plasmid pBO30A-15/9 (DSM 7246),

25

30

35

der eine erhöhte Biotinsynthese-Expression aufweist, als auch aus E. coli XL1-Blue mit dem Plasmid pBO74ΔB (DSM 7245), in dem das Biotinsynthese-Gen bioB deletiert ist (Fig. 7), isoliert werden. Plasmid pBO74ΔB wurde in E. coli XL1-Blue am 28. 5 9. 1992 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-3300 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Hinterlegungsnummer DSM 7245 hinterlegt.

Es wurde außerdem gefunden, daß für die Umsetzung von Dethio- 10 biotin zu Biotin neben der Biotinsynthese weitere Proteine erforderlich sind, die üblicherweise in einem Zellextrakt von E. coli enthalten sind. Diese Proteine sind in einer Proteinfraktion enthalten, die durch Ammoniumsulfat-Präzipitation bei 45%-iger Sättigung mit Ammoniumsulfat aus Zellextrakten von 15 E. coli erhältlich ist. Wie die Isolierung einer solchen Proteinfraktion aus E. coli XL1-Blue mit dem Plasmid pBO74ΔB (DSM 7245) zeigt, ist die Expression der Biotinsynthese für die Anwesenheit und zur Gewinnung dieser Proteine nicht erforderlich. Der nach der Ammonium-Präzipitation erhaltene Nieder- 20 schlag kann beispielsweise durch chromatographische Methoden wie Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltrationschromatographie weiter aufgereinigt werden. Zweckmäßig wird der Mischung zur Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin daher, insbesondere wenn die Biotinsynthese nicht in Form eines Zel- 25 lextrakts eingesetzt wird, eine wie oben beschrieben erhältliche Proteinfraktion zugesetzt.

Die Umsetzung erfolgt in einem geeigneten Puffersystem, zweck- 30 mäßig innerhalb der pH- und Temperaturbereiche, in denen die Enzyme physiologisch aktiv sind, vorzugsweise in einem pH-Bereich von 6 bis 9 und bei einer Temperatur zwischen 4 und 50°C.

Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen 35 weiter erläutert.

Allgemeine Verfahren:

Restriktionsendonukleasen wurden mit 3 bis 5 Units/ μ g DNA nach den Angaben der Hersteller eingesetzt. Markierung und Phosphorylierung von DNA-Linkern (bezogen von Boehringer Mannheim, BRD) zum Einbau von Restriktionsschnittstellen, und von synthetischen Oligonukleotiden (bezogen von Microsynth, Windisch, CH), beispielsweise zur Verwendung als Sonden für DNA/DNA-Hybridisierungen und als "Primer" für Sequenzierungsreaktionen, erfolgten mit T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer Mannheim, BRD) nach Sambrook et al. (Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY; 11.31 und 5.68; 1989). Ligationsreaktionen erfolgten mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben der Hersteller.

DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchsmethode nach Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5463-5467; 1977). Alle Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequenase-Kit von United States Biochemicals (Cleveland, OH, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Sequenase (Version 2.0, eine gentechnisch veränderte T7-DNA-Polymerase) ergab gleichmäßige, gut lesbare DNA-Sequenzen über mehr als 600bp; Kompressionen in GC-reichen DNA-Bereichen konnten leicht aufgelöst werden, wenn anstatt dGTP das Nukleotid dITP verwendet wurde. Als Matrizen für die Sequenzreaktion wurden in der Regel die Einzelstrang-Formen der Vektoren M13mp18/19 (Yanisch-Perron et al., 1985, ibid.) oder pBluescript KS⁺/SK⁺ (ap^R lacZ[']; erhältlich von Stratagene, La Jolla, CA) verwendet, die nach Messing (Methods Enzymol. 101:20-79; 1983) isoliert wurden. Zur Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde die Plasmid-DNA mittels CsCl₂-Gradienten oder "Gene Clean" (BIO 101, La Jolla, CA) gereinigt. Als radioaktiv markiertes Nukleotid wurde α [³⁵S]-dATP (NEN-Du Pont, NEG-034H) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte entweder über die üblichen 4% bzw. 6% Bis/Acrylamid-Gele mit 7M Harnstoff und 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5

mm EDTA), oder aber über Gele aus 5% HydroLink Long Ranger (AT Biochem, Malvern, PA, USA, via Chemie Brunschwig, Basel) mit 7M Harnstoff und 1,2 x TBE-Puffer. Die Gele waren 550 mm lang und 0,2 mm dick; die Elektrophorese erfolgte in einer LKB
5 Macrophor-Apparatur mit Thermostat bei einer Spannung von 2100V und einer Temperatur von 60°C. Anschließend wurden die Gele auf Whatman 3 MM Papier getrocknet und mit Röntgenfilm Fuji RX oder Amersham Hyperfilm β max autoradiografiert.

10 Die Isolierung extrachromosomaler DNA erfolgte entweder in kleineren Mengen nach der "rapid alkaline SDS" ("Miniprep")-Methode nach Birnboim und Doly (Nucl. Acid. Res. 7:1513-1523; 1979), oder, zur Isolierung größerer Mengen, durch Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation nach einer modifizierten
15 Methode nach Clewell und Helsinki (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42:1159-1166; 1969). Alternativ wurden QIAGEN-packs der Fa. DIAGEN, Düsseldorf (BRD) verwendet.

Zur Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA wurden die
20 Zellen nach Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114; 1972) in 50mM CaCl_2 kompetent gemacht. Die Transformation mit Plasmid-DNA und die Selektion plasmidtragender Klone erfolgte nach Sambrook et al. (1989; *ibid.* 1.82-1.84).

BEISPIEL 1

30 **Klonierung des E. coli Biotin-Operons in einer einzigen Transkriptionseinheit**

1.1 Konstruktion von pBO1 und M13bioD

Zur Klonierung der bio-Gene wurde die chromosomale DNA von E. coli DSM 498 (K12 "Wildtyp"; Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) isoliert. Die Isolierung
35 erfolgte im wesentlichen nach Hahn und Hennecke (Mol. Gen. Genet. 193:46-52; 1984). Anschließend wurden 2 μg Gesamt-DNA

von E. coli DSM 498 mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden in einem horizontalen 0,7% Agarosegel in üblicher Weise (Sambrook et al., 1989, *ibid.*; 6.19 bis 6.9) elektrophoretisch aufgetrennt und auf "Gene Screen" Membranen (Nylonmembranen von NEN-Du Pont) transferiert (Southern, J. Mol. Biol., 98:503-517; 1975). Die DNA wurde durch zweistündige Inkubation bei 80°C im Vakuumofen auf den getrockneten Filtern fixiert. Zur Identifizierung von DNA-Fragmenten mit dem bio-Operon wurde ein 25 Nukleotide langes synthetisches Oligonukleotid der Sequenz 5'-GGCTCACC GCCC CACGCTGGA-CATTG-3', entsprechend einer Sequenz aus dem 5'-Ende des bioB-Gens (Otsuka, A. J., Dissertation, University of California, San Diego, CA.; 1978) als Sonde mit der filtergebundenen DNA hybridisiert. Hierzu wurden zunächst 40 pMol dieses Oligonukleotids mit T4-Polynukleotid-Kinase und γ -[³²P]-ATP (75 μ Ci) endmarkiert. Die Hybridisierung der filtergebundenen DNA mit der radioaktiv markierten Sonde erfolgte nach Sambrook et al., (1989, *ibid.*, 9.52-9.55). Hierzu wurde die DNA zunächst 2 h in 5x Denhardt-Lösung (1x Denhardt-Lösung: 0,02% Rinderserumalbumin, 0,02% Ficoll, 0,01% Polyvinylpyrrolidin), 6x SSC-Puffer (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) und 150 μ g/ml Lachssperm-DNA prähybridisiert, anschließend 18 h in 2x Denhardt-Lösung, 6 x SSC, 0,5% SDS, 150 μ g/ml Lachssperm-DNA hybridisiert und 2 h gewaschen und schließlich viermal je 30 min lang in 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Temperatur betrug bei allen Schritten 65°C. Das markierte Oligonukleotid hybridisierte auf diesem "Southern blot" mit einem 5,4 kb langen PstI-Fragment.

Zur Klonierung dieses 5,4 kb-PstI-Fragments mit dem Biotin-Operon wurden zunächst 50 μ g der Gesamt-DNA von E. coli DSM 498 mit PstI geschnitten und auf einem 0,7% Agarosegel wie oben aufgetrennt. Fragmente mit einer Größe von 4,5 kb bis 6,5 kb wurden aus dem Gel ausgeschnitten und durch Elektrodialyse in Dialyseschläuchen isoliert. Ungefähr 0,6 μ g dieser Fragmente wurden mit 0,6 μ g des mit PstI geschnittenen Vektors pHE3

(Hennecke et al., Gene 19:231-234; 1982) ligiert. Dieser Vektor enthält das Gen für die Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R), das ColE1 Replikon aus pACYC184 (Chang und Cohen, J. Bacteriol., 134:1141-1156; 1978) sowie das E. coli Gen pheS für Phenylalanin-tRNA-Synthetase, das eine PstI-Stelle aufweist.

0,2 ml kompetente Zellen von E. coli RR28 (Hennecke et al., 1982, *ibid.*) in 50 mM CaCl_2 wurden mit diesem Ligationsansatz transformiert. E. coli RR28 hat im Chromosom ein mutiertes pheS-Gen (pheS12) und ist deshalb resistent gegen p-Fluorphenylalanin (pFphe) im Wachstumsmedium. Wenn RR28 das Plasmid pHE3 mit dem pheS Wildtyp-Gen trägt, ist der Stamm dagegen sensitiv gegen pFphe. Die Insertion von DNA-Fragmenten in die PstI-Schnittstelle von pHE3 unterbricht das pheS Wildtyp-Gen; RR28 mit einem rekombinierten Plasmid ist daher pFphe-resistent (pFphe^R). Transformierte Zellen wurden auf pFphe-Minimalmedium (7,1 g/l Na_2HPO_4 , 13,6 g/l KH_2PO_4 , 0,014 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l MgSO_4 , 1,58 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g/l Agar, 4 g/l Glucose, 0,005 g/l Thiamin, 0,05 g/l Leucin, 0,05 g/l Prolin, 0,2 g/l D,L-p-Fluorphenylalanin, 0,02 g/l Chloramphenicol; Hennecke et al., 1982, *ibid.*) plattiert und ca. 2500 Cm^R pFphe^R Klone wurden isoliert, die das Plasmid pHE3 (Cm^R) mit einem Insert im pheS-Gen (pFphe^R) enthielten. 600 dieser Klone wurden auf Nitrocellulose-Filter überstempelt, die auf Nutrient Agar (NA)-Platten (NA: Blood Agar Base (Oxoid), 40 g/l; Hefeextrakt (Oxoid), 5 g/l) mit 20 µg/ml Cm lagen. Filter mit angewachsenen Kolonien (3-5 mm Durchmesser) wurden nach Grunstein und Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961-3965; 1975) behandelt, um die Zellen zu lysieren und die freigesetzte DNA zu binden. Filter mit den lysierten und fixierten E. coli-Zellen wurden mit dem oben beschriebenen 25 Nukleotid langen und mit ^{32}P markierten bioB-Oligonukleotid hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte gemäß den Modifikationen für die Koloniehybridisierung nach Sambrook et al. (1989, *ibid.*, 11.00), d.h. die Prähybridisierung, die Hybridisierung und der erste Waschvorgang erfolgten in 4x Denhardt-Lösung, 6x SSC,

100 µg/ml Lachssperm-DNA, gefolgt von 6x Waschen in 2x SSC. Die Temperatur betrug 65°C. 3 Klone banden das bioB-Oligonukleotid; aus einem dieser Klone wurde das Plasmid pB01 mit dem 5,4 kb langen PstI-Fragment (Fig. 2) isoliert. Restriktions-

5 analysen und ein Vergleich mit publizierten Daten (Szybalski und Szybalski, Gene 19:93-103; 1982) zeigten, daß pB01 alle Gene des Biotin-Operons enthielt mit Ausnahme von bioD.

Zur Klonierung des bioD-Gens wurde eine Sonde mit Teilen der

10 Gene bioC und bioD verwendet, bestehend aus einem 520 bp langen SphI/PstI-Fragment aus pB01. Dieses Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und 0,2 µg des isolierten Fragments wurden mittels "Nick-Translation" mit DNA-Polymerase I (Boehringer Mannheim, BRD; Holoenzym aus *E. coli*; diese sog. "Korn-

15 berg-Polymerase" wurde zusammen mit DNase I verwendet) und 25 µCi α-[³²P]-dATP (NEN-Du Pont, NEG-012H) radioaktiv markiert (Sambrook et al., 1989, ibid. 10.8). Die Hybridisierung dieser Sonde mit durch SspI erzeugten Restriktionsfragmenten des E. coli DSM 498-Chromosoms auf einem "Southern blot" wie oben

20 beschrieben zeigte einerseits das aus pB01 bekannte 1,6 kb-SspI-Fragment mit bioF und bioC und andererseits ein 1,1 kb-SspI-Fragment mit bioD und Sequenzen des benachbarten Gens uvrB (Sancar et al., Cell, 28; 523-520; 1982).

Zur Klonierung des 1,1 kb-SspI-Fragments wurde wiederum eine partielle Genbank angelegt. Hierzu wurden 30 µg DNA von E. coli DSM 498 mit SspI geschnitten und auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Fragmente der Größe von 0,9 kb bis 1,3 kb wurden ausgeschnitten und durch Elektrodialyse isoliert. 0,5

30 µg dieser Fragmente wurden mit 0,5 µg des mit SmaI geschnittenen Phagenvektors M13mp19 (Yanisch-Perron et al., 1985, ibid.) ligiert. Mit diesem Ligationsansatz erfolgte eine Transfektion von E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., 1985, ibid) nach Messing (Methods Enzymol., 101:20-79; 1983). 150

35 Phagenklone mit Insert (Phänotyp LacZ⁻) wurden isoliert und in NYB-Medium vermehrt. Nach Abzentrifugieren der E. coli-Zellen

wurden die Phagen in je 50 µl der Überstände mit einer Schleicher & Schüll "minifold I" Apparatur als "dot blot" auf einen Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll BA 85) aufgetragen. Zur Denaturierung der Phagen wurden die Filter 5 min mit 0,1 M NaOH/1,5 M NaCl-Puffer behandelt und anschließend mit 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5/2,5 M NaCl (5 min) neutralisiert. Die DNA wurde durch Inkubation (2 h) bei 80°C auf dem Filter fixiert. Der Filter wurde wie beschrieben (Sambrook et al., 1989, ibid., 9.52-9.55) mit dem radioaktiv markierten 520 bp langen SphI/PstI-Fragment bei 60°C hybridisiert. Auf diese Weise wurde der Phagenklon M13**bioD** mit dem oben beschriebenen 1,1 kb-SspI-Fragment, das das bioD-Gen enthält, identifiziert (Fig. 2).

1.2 Konstruktion von pBO2

Jeweils 0,5 µg des Plasmids pBO1 und 0,5 µg des Phagen M13**bioD** wurden mit den Restriktionsenzymen SnoI und HindIII geschnitten und in einem Ansatz religiert. Nach Transformation von E. coli RR28 mit diesem Ansatz wurden rekombinierte Plasmide durch Restriktionsanalyse untersucht. Ein Plasmid, pBO2 (Fig. 2), wurde ausgewählt, in dem ein ca. 1,5 kb langes SnoI/HindIII-Fragment von pBO1, das einen Teil des bioD-Gens und nicht-essentielle Sequenzen des Vektors pHE3 enthält, durch ein 0,95 kb langes SnoI/HindIII-Fragment aus M13**bioD** ersetzt ist. Eine Analyse zeigte, daß das Plasmid pBO2 das komplette bio-Operon, wie es in E. coli vorliegt, zusammen mit Sequenzen des uvrB-Promotors (Sancar et al., Cell 28:523-530; 1982) stromabwärts von bioD enthielt.

1.3 Konstruktion von pBO3 und pBO6

Es wurde beobachtet, daß E. coli RR28 mit pBO2 auf NA-Platten schlechter wächst als mit pBO1 und deutlich kleinere Kolonien bildet. Die Ursache hierfür konnten die uvrB Sequenzen in pBO2 sein. Zur Deletion dieser uvrB Sequenzen wurden 20 µg pBO2-DNA mit HindIII geschnitten und in 150 µl Bal31-Puffer (600 mM NaCl, 12,5 mM MgCl₂, 12,5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2) aufgenommen. Dann wurde zur schritt-

weisen Verkürzung der linearen Plasmide Bal31 (aus Alteromonas espejiani, Boehringer Mannheim, BRD) zugegeben. Nach 3, 6, 9, 12 und 15 min Inkubation bei 30°C wurden Aliquots von je 30 µl entnommen und die Bal31-Reaktion durch Zugabe von je 2 µl 0,5 M EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure), pH 7,5, und anschließende Phenolextraktion gestoppt. Dann wurden die Aliquots in 40 µl Mung Bean Nuclease-Puffer (30 mM Natriumacetat, 50 mM NaCl, 1 mM ZnCl₂, 5% Glycerin, pH 4,6) aufgenommen und zur Entfernung ungepaarter Einzelstrangenden und Erzeugung unspezifischer stumpfer Enden 10 min bei 37°C mit Mung Bean Nuclease (Boehringer Mannheim, BRD) behandelt.

Bei der Behandlung mit Bal31 werden nicht nur die uvrB-Sequenzen, sondern auch essentielle Sequenzen des Vektors pHE3 entfernt. Daher wurden die verkürzten pBO2-Plasmide nach der Behandlung mit Mung Bean Nuclease mit EcoRI geschnitten, um den Teil der Vektor-DNA von pHE3 zu entfernen, der durch Bal31 verkürzt war. Die ursprüngliche Vektorsequenz wurde dann regeneriert, indem die behandelten pBO2-Plasmid mit einem 1,5 kb-DNA-Fragment ligiert wurden, das nach Restriktion mit BamHI, Behandlung mit Mung Bean Nuclease und einer weiteren Restriktion mit EcoRI aus pBO2 isoliert wurde und das die zuvor deletierten essentiellen Vektorsequenzen von pHE3 besitzt. Da durch diese Ligation die Cm-Resistenz des Vektors vollständig regeneriert wird, können intakte Plasmide über ihre Eigenschaft, Resistenz gegen Cm zu vermitteln, erkannt werden.

E. coli RR28 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert und auf NA-Platten mit 20 µg/ml Cm plattiert. Man beobachtete kleine, langsam wachsende Kolonien, wie sie für pBO2 typisch sind, und große, normal wachsende Kolonien. Die Anzahl der großen Kolonien pro pBO2-Aliquot nahm mit der Dauer der Bal31-Inkubation zu.

Aus 22 normal wachsenden Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktions- und Sequenzanalyse untersucht. Auf diese Weise wurden die Plasmide pBO3 und pBO6 erhalten, in

denen ca 330 bp bzw. 410 bp der uvrB Region deletiert waren, die aber das bioD-Gen noch vollständig besaßen.

1.4 Klonierung der bio-Gene in einer Transkriptionseinheit

5 1.4.1. Konstruktion von pB022: tac Promotor vor bioB

Zum Einbau eines geeigneten Promotors vor das Gen bioB muß der unerwünschte Wildtyp-Promotor vor den Genen bioBFCD entfernt werden. Dies kann durch Schneiden mit NcoI erfolgen, wodurch gleichzeitig das Startkodon des bioB-Gens freigelegt wird. Im vorliegenden Fall wurde als Promotor der tac-Promotor 10 (Russell und Bennett, 1982, *ibid.*) gewählt, da er als konstitutiver oder induzierbarer Promotor eingesetzt werden kann und nicht nur in E. coli, sondern auch in vielen anderen Gram-negativen Bakterien sehr gute Aktivität hat.

15 Ein DNA-Fragment mit dem tac-Promotor mit HindIII- und BamHI-Enden wurde von Pharmacia-LKB (Uppsala, Schweden) bezogen und in das mit HindIII und BamHI-geschnittene Plasmid pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985, *ibid*) eingebaut. Es resultierte das 20 Plasmid pUC18/tac (Fig. 2). 8 µg dieses Plasmids wurden dann mit BamHI geschnitten und zum Auffüllen der rezessiven 3'-Enden mit Klenow-Polymerase (DNA-Polymerase I aus E. coli; Boehringer Mannheim BRD) in Klenow-Polymerase-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 6 mM β-Mercaptoethanol) unter 25 Zusatz von je 100 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Restriktion mit AatII. Auf diese Weise konnte ein 0,55 kb langes DNA-Fragment mit dem tac-Promotor isoliert werden.

30 Ein 3,2 kb-Fragment mit den Genen bioB, bioF, bioC und dem 5'-Ende des bioD-Gens wurde aus pB01 isoliert. Dazu wurden 8 µg pB01 mit NcoI geschnitten und anschließend zum Auffüllen der rezessiven 3'-Enden wie oben mit Klenow-Polymerase behandelt. Anschließend erfolgte eine zweite Restriktion mit PstI, gefolgt von der Isolierung des gewünschten 3,2 kb-Fragments. 35

Schließlich wurden 4 µg des Vektors pHE3 mit PstI und AatII geschnitten und das P15A-Replikon aus pHE3 (Hennecke et al., 1982, ibid.) isoliert.

5 Diese drei Fragmente wurden zur Ligation der Überstehenden und glatten Enden in einem Ansatz in äquimolaren Mengen mit T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim, BRD) behandelt, wobei jeweils die überstehenden Enden von PstI mit PstI und von AatII mit AatII und die nach der Behandlung mit Klenow-Polymerase glat-
10 ten Ende von BamHI und NcoI miteinander ligiert wurden. Bei der Ligation des mittels Klenow-Polymerase aufgefüllten BamHI-Endes mit dem ebenso behandelten NcoI-Ende werden die BamHI- und NcoI-Schnittstellen regeneriert. E. coli RR28 wurde mit diesem Ligationsansatz transformiert und auf Cm^R selektio-
15 niert. Die Plasmid-DNA von Transformanden mit Cm^R wurde durch Restriktionsanalyse untersucht. Auf diese Weise wurde das Plasmid pBO21 (Fig. 2) erhalten, in dem sich der tac-Promotor vor dem bioB-Gen befindet. Durch Deletion eines 1,5 kb langen HindIII-Fragments aus pBO21, das nicht-essentielle Sequenzen
20 aus den Plasmidvektoren pHE3 und pUC18 aufweist, wurde schließlich pBO22 erhalten (Fig. 2).

1.4.2. Konstruktion von pBO27 und pBO28

5 5 µg pBO22 wurden mit PstI geschnitten und das überhän-
25 gende PstI-Ende durch Behandlung mit Mung Bean Nuclease zu einem glatten Ende verkürzt. Dann wurde mit SnoI geschnitten und das resultierende 6,8 kb lange DNA-Fragment isoliert. Ein 0,76 kb-DNA-Fragment mit dem 3'-Ende des bioD-Gens wurde aus 5 µg pBO3 nach Restriktion mit ClaI, Auffüllen der überhängen-
30 den ClaI-Enden mittels Klenow-Polymerase und Restriktion mit SnoI isoliert. Die beiden DNA-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase ligiert und dann wurde E. coli mit dem Ligations-
ansatz transformiert. Nach Selektion auf Chloramphenicol wurde aus den Transformanden mit Cm^R nach Restriktionsanalyse das
35 Plasmid pBO27 erhalten. Dieses Plasmid enthält den tac-Promo-

tor zusammen mit den Genen bioB, bioF, bioC und dem vollständigen bioD-Gen in einer Transkriptionseinheit (Fig. 2).

5 Zur Deletion der BamHI Schnittstelle in pBO27 wurden 5 µg pBO27 mit BamHI geschnitten, mit Klenow-Polymerase und dem Nukleotid dGTP wie oben beschrieben inkubiert und dann mit Mung Bean Nuclease behandelt. Nach Religation dieser DNA mit T4-DNA-Ligase und Transformation von E. coli DH5 (Hanahan, J. Mol. Biol. 166:557-580; 1983) wurde Plasmid pBO28 erhalten,
10 in dem die BamHI Schnittstelle deletiert ist, während die NcoI Schnittstelle erhalten geblieben ist (Fig. 2).

1.4.3. Konstruktion von M13bio18 und M13bio18/13

15 Zur Entfernung des unerwünschten Wildtyp-Promotors vor dem bioA-Gen wurde zunächst durch Restriktion von 5 µg pBO3 mit BglII und KpnI ein 4,4 kb-Fragment mit den Genen bioB, bioF, bioA und ORFI isoliert. 0,5 µg dieses Fragments wurden mit 0,5 µg des mit BamHI und KpnI geschnittenen Phagenvektors M13mp18 (Yanisch-Perron et al., 1985, *ibid.*) ligiert. Nach
20 Transformation von E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., 1985, *ibid.*) mit diesem Ligationsansatz wurden rekombinierte Phagenklone, die ein Insert besaßen, nach Messing (1983, *ibid.*) identifiziert; doppelsträngige Phagen-DNA aus solchen Klonen wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht.
25 Auf diese Weise wurde der Phage M13bio18 mit dem gewünschten 4,4 kb-Fragment erhalten (Fig. 2).

30 25 µg doppelsträngiger DNA des Phagen M13bio18 wurden durch Restriktion mit NcoI linearisiert, in 160µl Bal31-Puffer aufgenommen, und anschließend wurde Bal31 zur Entfernung des bioA-Promotors zugegeben. Nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Sekunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden Aliquots von je 25µl entnommen und die Bal31-Reaktion durch Zugabe von 2µl 0,5 M EGTA, pH 7,5, und Phenolextraktion gestoppt. Je 3 Aliquots wurden vereinigt und mit XbaI geschnitten, um die Gene bioB und bioF zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit Klenow-Polymerase wie oben behandelt, um überstehende 5'-Enden
35

zu glatten Enden aufzufüllen. Die so behandelte DNA wurde religiert und E. coli JM109 wurde mit der ligierten DNA transformiert. Von 24 Phagenklonen wurde einzelsträngige DNA isoliert (Messing, 1983, *ibid.*) und die DNA-Sequenz am 5'-Ende des bioA Gens wurde nach Sanger et al. (1977; *ibid.*) analysiert. Auf diese Weise wurde der Phagenklon M13bio18/13 erhalten, in dem der Wildtyp-Promotor vor dem bioA-Gen deletiert ist und der gleichzeitig eine SalI-Schnittstelle 26bp stromaufwärts des bioA-Gens aufweist (Fig. 2).

1.4.4. Konstruktion von M13bioDA

Zur Anordnung der Gene bioD und bioA in einer Transkriptionseinheit wurden 5µg des Plasmids pB06 (Fig. 2) mit SphI und SalI geschnitten. Das resultierende 0,97 kb lange DNA-Fragment, das das Gen bioD und 72bp der DNA stromabwärts des bioD-Gens bis zum SalI-Ende enthält, wurde isoliert. Ebenfalls mit SphI und SalI geschnitten wurden 2 µg von M13bio18/13. Die DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert und E. coli JM109 wurde transformiert. Aus 24 rekombinierten Klonen wurde doppelsträngige Phagen-DNA isoliert und mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Auf diese Weise wurde der Klon M13bioDA erhalten, in dem die Gene bioD und bioA 98bp voneinander entfernt sind (Fig. 2).

1.4.5. Konstruktion von pB030

Zur Konstruktion einer Transkriptionseinheit mit dem tac-Promotor vor den bio-Genen wurden 5µg DNA von M13bioDA mit EcoRI geschnitten, zum Auffüllen überhängender EcoRI-Enden wie oben mit Klenow-Polymerase behandelt und dann mit SnoI geschnitten. Das resultierende 2,6 kb lange DNA-Fragment mit den Genen bioD, bioA und ORFI wurde isoliert. 5 µg des Plasmids pB028 (Fig. 2) wurden mit SalI geschnitten, zur Abspaltung überhängender SalI-Enden mit Mung Bean Nuclease behandelt und dann ebenfalls mit SnoI geschnitten. Ein 6,7 kb langes DNA-Fragment mit Vektor-DNA, tac-Promotor und den Genen bioBFC wurde isoliert.

Die isolierten DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert und der Biotin-auxotrophe Stamm E. coli SA291 (Cleary und Campbell, J. Bacteriol. 112:830-839; 1972) wurde mit diesem Ligationsansatz transformiert. Durch Ausplattieren auf NA-Platten mit 20µg/ml Cm und 8µg/ml Avidin wurden Klone mit einem kompletten Biotin-Operon im Plasmid selektioniert. Plasmide aus solchen Klonen wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft. Auf diese Weise wurde Plasmid pBO30 erhalten, das die Gene bioB, bioF, bioC, bioD und bioA und das Gen ORFI zusammen mit dem tac-Promotor in einer Transkriptionseinheit enthält (Fig. 2).

1.5 Konstruktion von Plasmiden mit verbesserter Expression der bio-Gene

15 1.5.1. Konstruktion von pBO30A-9 und pBO30A-15

In Minizellen von E. coli DS410 (Dougan und Sheratt, Mol. Gen. Genet. 151:151-160; 1977) mit dem Plasmid pBO30 war die von dem bioA-Gen kodierte DAPA-Aminotransferase wesentlich schwächer exprimiert als die anderen Enzyme für die Biotin-Synthese. In einem Versuch, die Expression des bioA-Gens zu verbessern, wurde der Abstand zwischen dem bioD-Gen und dem bioA-Gen mit Exonuklease Bal31 verkürzt, um mögliche störende Sequenzen wie "stem-loop"-Strukturen zu entfernen. Dazu wurden 25µg pBO30 mit SalI geschnitten und dann wie oben beschrieben mit Exonuklease Bal31 und mit Klenow-Polymerase behandelt. Durch Ligation mit einem synthetischen Oligonukleotid der Sequenz 5'-CGTCGACG-3', einem SalI-Linker, wurde die SalI-Schnittstelle regeneriert. Dann wurde die DNA mit SalI und SnoI geschnitten und die am 3'-Ende verkürzten bioD-Fragmente mit einer Länge von etwa 640 bp isoliert. Diese Fragmente wurden mit einem 8,25 kb großen Fragment aus pBO30 ligiert, das nach Schneiden dieses Plasmids mit SalI und SnoI isoliert werden konnte und das unveränderte bioA-Gen enthält.

35 Der Biotin-auxotrophe Stamm E. coli SA291 wurde mit obigem Ligationsansatz transformiert, um dann auf NA-Platten mit 60µg/ml Cm und 5µg/ml Avidin Klone mit einem intakten bioD-

Gen zu selektionieren. Man erhielt 26 solcher Klone, die durch Restriktionsanalyse untersucht wurden. 8 dieser Klone mit offensichtlicher Verkürzung der Region stromaufwärts von der SalI-Stelle wurden durch DNA-Sequenzanalyse genauer charakterisiert. In fünf dieser Klone waren wie gewünscht etwa 20 bis 45 bp der DNA zwischen dem bioD- und dem bioA-Gen deletiert. In E. coli-Minizellen bewirkten diese Klone tatsächlich eine gegenüber pB030 um den Faktor 2 erhöhte Expression des bioA-Gens. Ein Beispiel für ein Plasmid mit derart verbesserter Expression ist das auf diese Weise erhaltene Plasmid pB030A-9 (Fig. 3).

Überraschend wurden drei weitere Plasmide isoliert, in denen 70 bis 90 bp der DNA zwischen dem bioD-Gen und dem bioA-Gen deletiert waren. Die Deletionen reichten also bis in das bioD-Strukturgen. Daraus resultierte (i) ein jeweils unterschiedlicher COOH-Terminus der DTB-Synthetase ohne große Veränderung der Enzymaktivität und (ii) eine Überlappung der veränderten bioD-Gene mit dem bioA-Leseraster. Auf diese Weise wurde beispielsweise Plasmid pB030A-15 mit der bioD-Gen-Mutante bioD15 erhalten (Fig. 3, 5 und 6). In E. coli-Minizellen mit pB030A-15 ist die bioA-Expression im Vergleich zu pB030 um den Faktor 4 erhöht.

Die DNA-Sequenzen der bioDA-Region und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Plasmide pB030, pB030A-9 und pB030A-15 sind in Fig. 3 dargestellt (Seq ID No 9-16).

1.5.2 Konstruktion von Plasmiden mit verbesserter Ribosomenbindungsstelle vor dem bioB-Gen

Zur Verbesserung der Translation des bioB-Gens, dessen Expression in pB030 deutlich schwächer ist als beispielsweise die des bioD-Gens, wurde die Sequenz stromaufwärts des bioB-Gens in pB030, die den tac-Promotor und eine Ribosomenbindungsstelle umfaßt, die in dem klonierten tac-Promotor-Fragment enthalten ist, modifiziert. Hierzu wurden synthetische, sogenannte gemischte oder "mixed" Oligonukleotide mit varia-

blen Sequenzen vor das Gen bioB gesetzt. Zur einfachen Auswahl günstiger Ribosomenbindungsstellen wurde ein Testplasmid mit einer translationellen bioB::lacZ Genfusion, pbioB::lacZ-2, verwendet. pbioB::lacZ-2 ist im Vektorteil, im tac-Promotor mit der Ribosomenbindungsstelle und im 5'-Ende des Gens bioB identisch mit dem Plasmid pB022 (Fig. 2). An einer NruI-Schnittstelle nach Nukleotid 326 des bioB-Strukturgens wurden aber das 3'-Ende des bioB-Gens und die restlichen bio-Gene deletiert und das lacZ-Gen von E. coli (Casadaban et al., Methods Enzymol. 100:293-308; 1983) so eingebaut, daß bioB und lacZ im korrekten Leseraster zur Expression eines bioB::lacZ Fusionsproteins fusioniert waren, und daß die NruI-Schnittstelle regeneriert wurde.

15 In das Plasmid pbioB::lacZ-2 wurde in mehreren Schritten das Oligonukleotid 985E mit der Sequenz 5'-CATGGAATCCTCCACTGATCAG-TAC-3' vor das bioB-Gen eingefügt (Fig 4). Hierzu wurde pbioB::lacZ-2 zunächst mit BamHI gespalten und dann die überhängenden BamHI-Enden wie beschrieben mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Bei diesen Schritten wurde offensichtlich ein Guanin-Rest (G) unspezifisch deletiert, was den Verlust einer BamHI-Schnittstelle in den späteren Plasmiden zur Folge hatte. Nach Einfügen eines KpnI-Linkers wurde E. coli XL1-Blue (Bullock et al., Biotechniques 5:376-379; 1987) mit dem Ligationsansatz transformiert und das Plasmid pbioB::lacZ/KpnI isoliert. Dieses Plasmid wurde mit NcoI partiell geschnitten und dann mit KpnI nachgeschnitten. Nach Ligation mit dem Oligonukleotid 985E wurde der zweite DNA-Strang mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Nach Transformation von E. coli XL1-Blue und Selektion auf NA-Platten mit 20µg/ml Cm, 30µg/ml X-Gal und 0,5 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid) konnte das Plasmid pbioB::lacZ/985E isoliert werden (Fig. 4). Plasmid pbioB::lacZ/985E wurde weiter variiert, indem die Ribosomenbindungsstelle durch Restriktion mit KpnI und SpeI ausgeschnitten und durch drei verschiedene gemischte Oligonukleotide, SD17, SD19 und SD21, ersetzt wurde (Fig. 4). Nach Ligation mit diesen Oligonukleotiden wurde durch Inkubation mit

Klenow-Polymerase die Lücke im zweiten DNA-Strang geschlossen. Bakterienzellen von E. coli XL1-Blue wurden mit dieser DNA transformiert und wie oben auf NA-Platten mit 20 µg/ml Cm, 30 µg/ml X-Gal und 0,5 mM IPTG plattiert. 20 Klone mit guter
5 Expression des bioB::lacZ-Fusionsproteins, die auf diesem Medium dunkelblaue Kolonien bildeten, wurden ausgewählt und die β -Galaktosidase-Aktivität dieser Klone wurde mit einem Enzym-Assay nach Miller (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., S.
10 352-355; 1972) gemessen. Hierzu wurden zuvor die E. coli-Stämme mit bio::lacZ-Plasmiden in Flüssigkultur bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,5 angezogen.

Die höchste β -Galaktosidase-Aktivität zeigten die Plasmide
15 pbioB::lacZ/985E, pbioB::lacZ/16 und pbioB::lacZ/9 (Fig. 4), bei denen die β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zu pbioB::lacZ-2 um den Faktor 2,1, 3,4 bzw. 5,9 gesteigert war. Die DNA-Sequenz der optimierten Ribosomenbindungsstellen für das bioB-Gen in diesen Plasmiden wurde nach Sanger et al.
20 (1977, *ibid.*) bestimmt.

Zum Einbau der optimierten Ribosomenbindungsstellen in eine Transkriptionseinheit mit den bio-Genen wurden jeweils 5 µg der Plasmide pbioB::lacZ/985E, pbioB::lacZ/16 oder
25 pbioB::lacZ/9 mit ClaI und NruI geschnitten und ein ca. 550bp langes DNA-Fragment mit dem tac-Promotor, der jeweiligen Ribosomenbindungsstelle und dem 5'-Ende des bioB-Gens isoliert. Gleichzeitig wurden 5 µg des Plasmids pBO30 Δ A (Fig. 5) mit ClaI und NruI geschnitten und ein 7,7 kb langes DNA-Fragment
30 isoliert. In pBO30 Δ A, das sich von pBO30 ableitet, ist ein SalI/BamHI-Fragment mit dem Großteil des bioA-Gens und einer störenden NruI-Schnittstelle deletiert (Fig. 5). Die beiden Fragmente wurden ligiert und Klone mit rekombinierten Plasmiden wurden isoliert. Auf diese Weise wurden die Plasmide pBO30
35 Δ A/9, pBO30 Δ A/16 und pBO30 Δ A/985 erhalten. Fig. 5 zeigt eine

solche Konstruktion am Beispiel von pBO304A/9 mit der Ribosomenbindungsstelle aus p**bio**B::lacZ/9.

Je 2 µg der Plasmide pBO304A/9, pBO304A/16 und pBO304A/985E wurden mit SnoI und KpnI geschnitten, wobei KpnI in geringer Menge eingesetzt wurde, um nur partiell zu schneiden. Dann wurden jeweils 6,6 kb lange DNA-Fragmente isoliert, die die Vektor-DNA, den tac-Promotor, das bioB-Gen mit der verbesserten Ribosomenbindungsstelle und die Gene bioFC enthielten. Das Plasmid pBO30A-15 (4 µg) wurde ebenfalls mit SnoI und NcoI geschnitten und ein 2,8 kb-Fragment mit den Genen bioDA-ORFI isoliert. Die isolierten Fragmente wurden ligiert und E. coli RR28 wurde mit der Ligationsmischung transformiert. Rekombinierte Plasmide mit einem kompletten Biotin-Operon wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Auf diese Weise wurden die Plasmide pBO30A-15/9, pBO30A-15/16 und pBO30A-15/985E erhalten. Diese enthalten alle die optimierte bioDA-Region aus pBO30A-15 mit den entsprechenden optimierten Ribosomenbindungsstellen aus den Plasmiden p**bio**B::lacZ/9, p**bio**B::lacZ/16 bzw. p**bio**B::lacZ/985E. Die genetischen Kontrollelemente dieser Plasmide, nämlich die Kombination aus tac-Promotor und optimierter Ribosomenbindungsstelle, die in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen stehen und dessen effiziente Expression bewirken, weisen die folgenden Sequenzen auf:

25

pBO30A-15/985E (Seq ID No: 17)

5'-AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTTAGGAGG TGACTAGTC-3'

30

pBO30A-15/16 (Seq ID No: 18)

5'-AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGG TTTACTAGTC-3'

35

pBO30A-15/9 (Seq ID No: 19)

5'-AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTC-3'

Fig. 5 zeigt die Konstruktion von Plasmiden, die die Gene bioB, bioF, bioC, bioD und bioA zusammen mit einer optimierten Ribosomenbindungsstelle enthalten, am Beispiel der Konstruktion von pBO30A-15/9.

5

Die gesamte Transkriptionseinheit der bio-Gene in pBO30A-15/9 wurde sequenziert. Die Sequenz und die davon abgeleiteten Genprodukte sind in Fig. 6 dargestellt (Seq ID No: 1 - 8)

10

1.6 Konstruktion von pBO30A-15/9 Δ orfI

15

2 μ g des Plasmids pBO30A/9 wurden wie oben mit SnoI und KpnI geschnitten und das 6,6 kb lange DNA-Fragment wurde isoliert. 4 μ g des Plasmids pBO30A-15 wurden mit SspI geschnitten. Durch Ligation der resultierenden linearen DNA mit einem KpnI-Linker der Sequenz 5'-CGGTACCG-3' wurde stromabwärts des bioA-Gens eine neue KpnI-Stelle eingefügt. Nach Schneiden mit SnoI wurde ein 2,1 kb-Fragment mit den Genen bioDA isoliert. Die isolierten DNA-Fragmente wurden ligiert und E. coli RR28 wurde mit der Ligationsmischung transformiert. Rekombinierte Plasmide mit den Genen bioBFCDA wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Auf diese Weise wurde pBO30A-15/9 Δ orfI mit einer Deletion des ORFI-Gens erhalten (Fig. 5).

20

1.7 Konstruktion von Plasmid pBO47

25

30

35

5 μ g des Plasmids pBO30A-15/9 wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und EcoRI geschnitten. Das resultierende 5,8 kb große Restriktionsfragment mit dem tac-Promotor und dem Biotin-Operon wurde isoliert und anschließend mit dem "broad-host-range" Plasmid pRK290X (Alvarez-Morales et al., Nucl. Acid. Res. 14, 4207-4227, 1986; modifiziert durch Deletion einer XhoI Restriktionsstelle und Einfügen einer XbaI-Stelle an derselben Position) ligiert, das ebenfalls mit XbaI und EcoRI geschnitten war. Mit dem Ligationsansatz wurde E. coli S17-1 (Simon et al., Biotechnology 1:784-791; 1983) transformiert. Rekombinierte Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse charakterisiert; auf diese Weise wurde Plasmid pBO47 erhalten, das das Biotin-Operon integriert in pRK290X enthält.

Durch Konjugation mit dem Stamm E. coli S17-1/pB047 wurde das Plasmid pB047 in die Bakterienstämme Rhizobium/Agrobacterium sp. HK4, Pseudomonas mondocina, Pseudomonas aeruginosa PA01 (Holloway, J. Gen. Microbiol. 13:572-581; 1955) und Acinetobacter calcoaceticus DSM 588 transferiert.

1.8 Konstruktion von pB074ΔB

Die Konstruktion von Plasmid pB074ΔB mit einer Deletion des bioB-Gens erfolgte ausgehend von Plasmid pB074-13 (Fig. 7). Plasmid pB074-13 besteht aus den gleichen DNA-Bausteinen wie pB030 (Fig. 2). Die Reihenfolge der bio-Gene innerhalb des Plasmids pB074-13 ist jedoch verschieden.

5µg des Plasmids pB074-13 wurden mit SmaI geschnitten. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die Plasmid-DNA mit SphI geschnitten und ein 6 kb-Fragment enthaltend die Vektor-DNA, den tac-Promotor, die Gene bioA-ORFI und bioCD wurde isoliert. 18µg des Plasmids pB03 (Fig. 2) wurden mit SspI und SphI geschnitten und ein 1,66 kb-Fragment mit dem bioF-Gen und einem Teil des bioC-Gens isoliert. Die isolierten Fragmente wurden miteinander ligiert und E. coli RR28 wurde mit der Ligationsmischung transformiert. Rekombinierte Plasmide wurden mittels Restriktionsanalyse analysiert. Auf diese Weise wurde Plasmid pB074ΔB erhalten, das sich von Plasmid pB074-13 durch die Deletion des bioB-Gens unterscheidet (Fig. 7).

Beispiel 2

30 In vivo Fermentationen von Biotin

2.1 In vivo Fermentation von Biotin mit Escherichia coli Produktions-Stämmen

Zellen des E. coli-Stammes XL1-Blue mit pB030A-15/9 (DSM 7246) wurden mit einem 20 l MBR-Fermenter in Glycerin-Minimal-Medium (3% Glycerin bei Start der Kultur) in einem fed batch Verfahren über 30 h lang bei 37°C bis zu einer optischen

Dichte bei 650 nm (OD_{650}) von 20 angezogen. Die Anwesenheit von Plasmid pB030A-15/9 wurde durch Zugabe von Chloramphenicol (50 μ g/ml) in der Vorkultur (3 l Glycerin-Minimal-Medium) und der batch-Phase der Fermentation sichergestellt. Die Verwendung anderer Kohlenstoffquellen wie Glucose oder Succinat (0,4 % bei Beginn der batch-Fermentations-Phase) war ebenso praktikabel. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde anhand ihrer spezifischen Sauerstoff-Aufnahmerate verfolgt. Die Produktion von Biotin während der Fermentation wurde durch Titration der Biotin-Werte des Fermenter-Mediums mit einem Bioassay mit Lactobacillus plantarum verfolgt (E. DeMoll und W. Shive, Anal. Chem. 158:55-58, 1986).

Die Kohlenstoffquelle, in diesem Fall eine 50%-ige Glycerinlösung in deionisiertem Wasser, wurde mit variabler, der jeweiligen Biomasse-Entwicklung angepasster Zuflussrate zugeführt. Für Glycerin wurde ein empirischer Wert von 2 g Glycerin pro Liter Kultur für einen OD-Zuwachs von OD 1 auf OD 2 für die "feed"-Rate zugrunde gelegt.

Der pH des Fermenters wurde durch Zupumpen von 40 %-iger H_3PO_4 bzw. 25 %-igem NH_3 automatisch auf pH 7 eingeregelt. Die Belüftung wurde durch Einblasen von 10-25 NL/min Luft und Rotation des Rührers mit 300-700 rpm entsprechend der jeweiligen Biomasse-Entwicklung geregelt. Eine Sauerstoffsättigung zwischen 15 und 40 % wurde angestrebt. Der Sauerstoff- und der CO_2 -Gehalt der Abluft wurde paramagnetisch bzw. mittels Infrarot gemessen. Die Temperatur des Fermenters wurde auf 37°C eingeregelt. Bei 37°C wuchs die Kultur mit einer Verdopplungszeit von 2,5 Stunden bis zu einer OD_{650} von 20 und wurde dann stationär.

Während der Fermentation häuften sich innerhalb von 25 Stunden 35 mg/l D(+)-Biotin an. In E. coli-Stämmen ist eine nennenswerte Biotin-Synthese nur in wachsenden Kulturen zu erreichen.

Als weitere geeignete Produktionsstämme erwiesen sich E. coli ED8767 (N. E. Murray et al., Mol. Gen. Genet. 150:53-61; 1975) mit pBO30A-15/9 (DSM 8554) oder E. coli BM4062 (D. F. Barker und A. M. Campbell, J. Bacteriol. 143:789-800; 1980) mit pBO30A-15/9 (DSM 7247).

In ähnlicher Weise wurden die Plasmide pBO3, pBO30 und pBO30A-15/9 Δ ORFI getestet und die Biotinproduktivität bestimmt. Die nachfolgende Tabelle I zeigt die starke Verbesserung der Biotin-Produktivität von Stämmen mit den Plasmiden pBO30, pBO30A-15/9 und pBO30A-15/9 Δ ORFI, die die bio-Gene in einer Transkriptionseinheit besitzen, im Vergleich mit E. coli S17-1 (Wildtyp, Biotin-Gene auf dem Chromosom) und E. coli S17-1/pBO3 (Biotin-Gene auf dem Plasmid, jedoch divergente Transkription wie im Wildtyp-Operon). Die Versuche zeigen ferner, daß das Fehlen des ORFI-Gens keinen Einfluß auf die Biotin-Produktivität hat.

Tabelle I

Stamm	Biotin-Produktivität pMol/min x 10 ⁹ Zellen
<u>E. coli</u> S17-1	0,01 - 0,02
<u>E. coli</u> S17-1/pBO3	0,02 - 0,04
<u>E. coli</u> BM 4062/pBO30	3,0 - 5,0
<u>E. coli</u> XL1 Blue/pBO30A-15/9	10,0 - 20,0
<u>E. coli</u> BM 4062/pBO30A-15/9 Δ ORFI	10,0 - 20,0

Glycerin-Minimal-batch-Medium (in deionisiertem H₂O)

	Glycerin	30	g/l
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,8	g/l
5	CaCl ₂	0,16	g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g/l
	Spurenelemente SLF ^{a)}	1,0	ml/l
	Fe-EDTA ^{b)}	1,5	ml/l
	PPG-2000	0,1	g/l
10	KH ₂ PO ₄	1	g/l
	K ₂ HPO ₄	1	g/l
	Na ₂ HPO ₄	1	g/l
	Thiamin	1	g/l
	Chloramphenicol	50	mg/l
15	IPTG	0,5	mM

a) Stammlösung Spurenelemente SLF (in deionisiertem H₂O)

	KOH	15	g/l
	EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O	100	g/l
20	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	9	g/l
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	4	g/l
	H ₃ BO ₃	2,7	g/l
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	1,8	g/l
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	1,5	g/l
25	NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,18	g/l
	Na ₂ Mo ₄ O x 2H ₂ O	0,2	g/l

b) Stammlösung Fe-EDTA (in deionisiertem H₂O)

	EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	50	g/l
30	FeSO ₄ x 7H ₂ O	20	g/l
	KOH	10	g/l

Antibiotika-Supplemente: (Endkonzentrationen)

35	100 µg/ml Ampicillin (Natriumsalz, Fluka) und 50 µg/ml Chloramphenicol (Fluka).		
----	---	--	--

2.2 In vivo Fermentation von Biotin mit dem Agrobacterium/ Rhizobium-Produktions-Stamm HK4/pBO47

Zellen des Biotin-auxotrophen Stammes Agrobacterium/
Rhizobium sp HK4 mit dem Biotin-Produktions-Plasmid pBO47 (DSM
5 8555) wurden in einem 2 l MBR-Fermenter in einem L-Glutamin-
säure/Betain Minimalmedium in einem fed-batch Verfahren bei
30°C bis zu einer OD₆₅₀ von 70 angezogen. HK4/pBO47 ist durch
eine bemerkenswert stabile Biotin-Synthese-Rate auch bei ex-
trem langsamen Wachstum ("maintenance growth") gekennzeich-
10 net. Deshalb schloss sich in diesem Experiment nach der An-
zucht der Biomasse eine lange maintenance Phase (500 Stunden)
bei stark reduziertem Kohlenstoff-"feed" an.

Nach der exponentiellen Wachstumsphase, nach Erreichen einer
15 OD₆₅₀ von 12, wurde ein Glucose-Betain-"feed" (360 g/l Glucose
plus 103 g/l Betain gelöst in deionisiertem Wasser) langsam
dosiert (1,5 ml/Stunde) zugefüttert, um langanhaltendes lang-
sames Wachstum bzw. "maintenance growth" zu ermöglichen. Zum
Zeitpunkt 150 Stunden wurden bis zu einer Endkonzentration von
20 100 mg/l im Fermenter Fe²⁺-Gluconat nachgefüttert. Zu den
Zeitpunkten 200, 360 und 550 Stunden wurden 10 ml Salz-Lösung
und 1,36 ml Standard-Vitamin-Lösung nachgefüttert.

Der pH des Fermenters wurde durch Zupumpen von 85%-iger Phos-
25 phorsäure bzw. 3M Kalilauge automatisch auf pH 7 eingeregelt.
Die Belüftung wurde durch Einblasen von 1-3 NL/min Luft und
Rotation des Rührers mit 300-1000 rpm entsprechend der jewei-
ligen Biomasseentwicklung geregelt, so dass eine Sauer-
stoffspannung von 1-4 mg/l gewährleistet war. Die Temperatur
30 des Fermenters wurde auf 30°C eingeregelt. Die Kultur wuchs
in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Verdopplungs-
zeit von 5,6 Stunden, in der Phase mit stark limitiertem
"feed" mit einer Verdopplungszeit von 300 Stunden und schwenk-
te dann zu "maintenance growth" um.

Zu Beginn der Fermentation, nach 200 Stunden und nach 415 Stunden wurde Diaminopelargonsäure (DAPA; zweimal zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml, zuletzt zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml) zur Kultur zugegeben. HK4 selbst ist Biotin auxotroph. Der Stamm war in der Lage aus dem Biotin-Vorläufer DAPA Dethiobiotin zu erzeugen und dieses schließlich mit hoher Ausbeute in D(+)-Biotin umzusetzen. Es wurden 110 mg/l D(+)-Biotin angehäuft. Bemerkenswert hieran ist, dass diese Synthese zum überwiegenden Anteil von nichtwachsenden Zellen vollzogen wurde.

Glutaminsäure/Betain-Minimalmedium

In 1,25 Liter deionisiertem Wasser wurden gelöst, bzw. dazu zugegeben:

31,25 g L-Glutaminsäure Mononatriumsalz x H₂O
12,5 g Betain
0,2 g CaCl₂
1,0 g MgCl₂ x 6 H₂O
1,25 g K₂SO₄
1,25 ml Spurenelemente SLF (Beispiel 2.1)
1,87 ml Fe-EDTA (Beispiel 2.1)
0,25 ml Tetracyclin (10 mg/ml in 70% Ethanol)

25

Salz-Lösung

0,03 g CaCl₂
0,16 g MgCl₂ x 6 H₂O
0,2 g K₂SO₄
200 µl SLF (Beispiel 2.1)
300 µl HCl konz.
(gelöst in 10ml deionisiertem H₂O)

35

Standard-Vitaminlösung (in deionisiertem H₂O)

	10 mg/l	Pyridoxalhydrochlorid
	5 mg/l	Riboflavin
5	5 mg/l	Nicotinsäureamid
	5 mg/l	Thiamin-hydrochlorid
	2 mg/l	Biotin
	5 mg/l	Pantothersäure
	5 mg/l	4-Aminobenzoessäure
10	2 mg/l	Folsäure
	5 mg/l	Vitamin B12

Beispiel 3

15

**Herstellung von Biotin ausgehend von Dethiobiotin
(Messung der Biotinsynthese-Reaktion in Vitro)****3.1 Herstellung von E. coli-Zellextrakten**

20 Es wurde je ein Zellextrakt aus E. coli XL1-Blue (DSM 7246) mit dem Plasmid pBO30A-15/9 (Extrakt Z) und ein Zellextrakt aus E. coli XL1-Blue mit dem Plasmid pBO74ΔB (DSM 7245; Extrakt W) hergestellt. Dazu wurden die Mikroorganismenzellen bei 37°C in einem Volumen von 800 l mit einer OD₆₀₀ von 2 in einem Medium mit 20g/l Nutrient Broth, 5g/l Hefe-Extrakt und 20mg/l Cm angezüchtet. Die Zellen wurden durch Filtration geerntet und anschliessend bei 5000 x g 15 min lang zentrifugiert.

30 Zur Herstellung des zellfreien Extraktes wurden die Zellen mit 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) gewaschen, dann in dem gleichen Puffer resuspendiert um eine OD₆₀₀ von annähernd 1'000 einzustellen und dann mit DNase behandelt. Anschliessend wurden die Zellen mit einem kontinuierlichen Zellhomogenisator bei 35 100'000 Pa aufgebrochen. Das Homogenat wurde bei 20'000 x g 30 min lang zentrifugiert und der resultierende Überstand bei

-80°C aufbewahrt. Extrakt Z konnte dann entweder direkt zum Messen (Testen) der Biotinsynthese-Reaktion verwendet werden oder erst nach Reinigung durch Gel-Filtration an einer mit Sephadex G25M PD-10 (Pharmacia, Säulenvolumen: 9,1 ml) beladenen Säule. Extrakt W wurde entweder direkt zum Testen der Biotinsynthese-Reaktion eingesetzt oder gemäss Beispiel 3.3 fraktioniert.

3.2 In-Vitro-Test der Biotinsynthese-Reaktion (Standardtest)

In dem In-Vitro-Test wurde entweder die Reaktion von ^{14}C -markiertem Dethiobiotin (0,1 μCi ; 1,95 nmol) zu ^{14}C -markiertem Biotin oder die Reaktion von nicht-markiertem Dethiobiotin mit ^{35}S -markiertem Cystein (20 μCi ; 1,32 nmol) zu ^{35}S -markiertem Biotin mit dem Enzym Biotinsynthase untersucht. Das dabei gebildete ^{14}C -Biotin oder ^{35}S -Biotin konnte leicht, nach Extraktion, durch quantitative HPLC, an einem "on-line" radiochemischen Detektor oder halbquantitativ mittels Dünnschichtchromatographie und anschliessendem Auflegen eines Röntgenfilms mittels Autoradiographie bestimmt werden.

Ein typischer Standardtest bestand aus dem zellfreien Extrakt Z oder W, aus markiertem oder nicht-markiertem Dethiobiotin, je nach Reaktion, oder aus den daraus gereinigten Proteinfraktionen (Beispiele 3.7 - 3.9) einzeln oder in Kombination miteinander und/oder aus üblichen Cofaktoren wie SAM (92 μM), Fe^{2+} -gluconat (200 μM), NADPH (100 μM), TPP (100 μM), DTT (1mM) und/oder aus einer Kombination von Aminosäuren. Die zu testenden Protein-Fraktionen, Cofaktoren oder Aminosäuren wurden in einem Endvolumen von 250 μl hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt zwischen 4 und 50°C. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 12 Gew.% Trichloressigsäure (TCA) in Wasser gestoppt. Das ausgefällte Protein wurde zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine C_{18} "solid-phase" Extraktionssäule (MACHEREY-NAGEL, 100 mg) aufgetragen, die mit Methanol (1 ml), Wasser (1 ml) und mit Essigsäure (1 Vol.%) in Wasser, equilibriert worden war. An-

schliessend wurde diese Säule mit 1 ml 1%iger Essigsäure und 1 ml Wasser gewaschen um dann Biotin und Dethiobiotin mit 0,5 ml Methanol zu eluieren. Die erhaltenen Proben wurden im Vakuum getrocknet und dann in 30 μ l HPLC-Puffer A (25 mM KH_2PO_4 , 5 mM Tetrabutylammoniumchlorid (pH 3,4) resuspendiert, um dann 25 μ l in die HPLC für die quantitative Analyse zu injizieren. Die HPLC-Bedingungen waren die folgenden: Shandon-Hypersil-BDS- C_{18} -Säule (Partikelgrösse: 5 μ m, Säulengrösse 10 mm x 2,0 mm), Durchflussrate 0,35 ml/min, Temperatur 40°C, Elutionsmittel: HPLC-Puffer A mit 10 Vol.% Acetonitril.

Nach dem Mischen des Eluatstroms mit einer Szintillationsmesslösung (Zinsser Quickszint Flow 303; Durchflussrate: 1,25 ml/min) wurde entweder nicht umgesetztes ^{14}C -Dethiobiotin und gebildetes ^{14}C -Biotin oder gebildetes ^{35}S -Biotin detektiert und quantifiziert ("on-line" Radioaktivitätsdetektor: Berthold).

Alternativ wurden die Proben halbquantitativ mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie analysiert. Hierzu wurden die Proben in 20 μ l einer Mischung bestehend aus 10% Essigsäure, 65% Methanol und 25% Wasser resuspendiert und 2,5 μ l auf eine Silicagel-"high performance"-TLC-Platte (E. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Platte wurde mit einem Laufmittel bestehend aus Chloroform (17 ml), Methanol (3 ml) und Ameisensäure (0,2 ml) entwickelt. Nach der Chromatographie wurde die Platte getrocknet und über Nacht dann ein Röntgenfilm aufgelegt.

3.3 Biotinsynthese-Reaktion in Gegenwart von Aminosäuren

Wenn der entsalzte zellfreie Extrakt Z mit Dethiobiotin entsprechend zu Beispiel 3.2 und den Cofaktoren SAM, TPP, NADPH und Fe^{2+} -gluconat inkubiert wurde, wurde keine Umwandlung von Dethiobiotin zu Biotin beobachtet. Wurde Cystein (332 μ M) und Asparagin (15mM) oder Cystein und Asparat (15mM) oder Cystein und Glutamin (15mM) oder Cystein und Serin (15mM)

mit den Cofaktoren gemäss Beispiel 3.4 zu diesem zellfreien Extrakt hinzugegeben, konnte eine Biotin-Produktion nachgewiesen werden

5

Tabelle II

	Zusammensetzung des Tests	pmol produziertes Biotin
	Extrakt Z ¹	0
10	" + Cofaktoren ²	0
	" + Aminosäuren ³	0
	" + Cofaktoren ² + Aminosäuren ³	780
	1) entsalzt	
15	2) Cofaktoren: SAM, Fe ²⁺ , TPP, NADPH	
	3) Cys + Asn oder Cys + Asp oder Cys + Gln oder Cys + Ser	

20 3.4 Biotinsynthese-Reaktion in Gegenwart von einem oder mehreren üblichen Cofaktoren

Wenn der gleiche wie in Beispiel 3.3 beschriebene entsalzte Zellextrakt mit L-Cystein, Asparagin, Dethiobiotin, SAM, TPP, NADPH und Fe²⁺-gluconat inkubiert wurde, wurde Dethiobiotin zu Biotin umgewandelt. Um den Einfluss dieser Cofaktoren auf die Biotinsynthese-Reaktion zu testen, wurden diese einzeln und in Kombination miteinander eingesetzt. Nur eine Kombination von allen diesen Cofaktoren zeigte Biotinsynthese-Aktivität. Fehlte ein Cofaktor, konnte keine Biotinsynthese-Aktivität gemessen werden, d.h. alle Cofaktoren sind für die Biotinsynthese-Aktivität notwendig (Beispiel 3.3, Tabelle II).

30 3.5 Reinigung der Biotinsynthese

Zum Beweis, daß zusätzlich zur Biotinsynthese mehrere Proteine für die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin verantwortlich sind, wurde zunächst der zellfreie Extrakt Z einer

35

Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterworfen. Diese wurde bei einer Sättigung von 25% Ammoniumsulfat unter Rühren, 30 min, bei 4°C durchgeführt. Dann wurde bei 10'000 x g 30 min lang zentrifugiert und das resultierende Pellet verworfen. Der resultierende Überstand wurde mit 70% Ammoniumsulfat gesättigt, wobei die Biotinsynthese ausgefällt wurde. Das Präzipitat wurde in einem kleinen Volumen von 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) resuspendiert, entsalzt (Sephadex G25M PD-10) und dann mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (Q-Sepharose Fast-Flow, Pharmacia), mit einem kontinuierlichen Gradienten von 100 mM - 1 M HEPES-Puffer (pH 7,5)), gereinigt. Die Fraktionen mit Biotinsynthese-Aktivität wurden konzentriert (Amicon Ultrafiltrationszelle, YM-10 Membran), wie bereits beschrieben entsalzt und anschliessend an einer Q-Sepharose "Hi-Load" Anionenaustauscher-Chromatographie-Säule rechromatographiert (Pharmacia; 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) enthaltend 1 mM DTT und einen 0 - 1 M NaCl-Gradienten). Die Fraktionen mit hoher Biotinsynthese-Aktivität wurden vereinigt, konzentriert und entsalzt. In diesen Fraktionen war die Biotinsynthese nicht mehr mit anderen Proteinen, die für die Biotinsynthese-Aktivität notwendig sind, kontaminiert.

Um die Biotinsynthese-Aktivität während der Reinigungsschritte zu messen war es notwendig, zur Testmischung (Beispiel 3.2) Extrakt W, hinzuzugeben. Demzufolge sind die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin neben Biotinsynthese noch weitere Proteine verantwortlich.

3.6 Fraktionierung von Proteinen aus dem Extrakt W

Hierzu wurde der Extrakt aufeinanderfolgend bei 45% und 55% Sättigung an Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach Ammoniumsulfatzugabe wurde das Ganze bei 4°C 30 min lang gerührt und anschliessend bei 10'000 x g für 30 min zentrifugiert. Der bei 45% Sättigung an Ammoniumsulfat erhaltene Niederschlag wurde in 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Anschliessend wurden Aliquots von dem 45%-Präzipitat, dem 55%-Präzipitat und dem 55%-Überstand entnommen und entsalzt (Sephadex G25M PD-10

Säule). Die einzelnen Fraktionen wurden sowohl individuell als auch in Kombination miteinander, gemäss Beispiel 3.2 getestet.

Es wurden 2 Fraktionen erhalten, die für die Biotinsynthese notwendig sind. Diese Fraktionen waren:

- der Niederschlag aus 45% Sättigung an Ammoniumsulfat
- der Überstand aus 55% Sättigung an Ammoniumsulfat

3.7 Reinigung und Identifizierung von Flavodoxin

Der Überstand, der nach 55% Sättigung an Ammoniumsulfat aus Extrakt W (Beispiel 2.2) resultierte, wurde entsalzt (Sephadex G25M PD-10 Säule) und anschliessend auf eine Anionenaustauscherchromatographie-Säule (Q-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia)) aufgetragen. Diese Säule war zuvor mit 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) enthaltend 1 mM DTT äquilibriert worden. Das nicht gebundene Material wurde durch Waschen mit diesem Puffer entfernt. Die an der Säule gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0 - 1M) eluiert. Die eluierten Proteinfraktionen wurden vereinigt, konzentriert (Amicon Ultrafiltration Zelle, YM-10 Membran), entsalzt (Sephadex G25M PD-10) und anschliessend an einer Mono Q-Anionenaustauscher-Chromatographiesäule, die mit 20 mM Tris-Puffer (pH 7,0, enthaltend 1 mM DTT) equilibriert worden war, gereinigt. Dann wurden die gereinigten Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht.

Um während der Reinigungsschritte die Fraktionen, die das gesuchte Protein enthalten, zu identifizieren, wurde das Biotinsynthese-Test-System (Beispiel 3.2) mit gereinigter Biotinsynthese, Protein bzw. Proteinen aus dem Niederschlag der 45% Ammoniumsulfat-Fällung, mit Aminosäuren (Beispiel 3.3) und mit niedermolekularen Cofaktoren (Beispiel 3.4), durchgeführt. Biotinsynthese-Aktivität konnte nur in den Fraktionen gemessen werden, die das gesuchte Protein enthielten.

Anschliessend wurde die Aminosäuresequenz dieses Proteins wie folgt bestimmt. Das Protein wurde mit DTT 4 h lang in 6 M Gua-

nidin-HCl-Puffer reduziert. Die erhaltenen Proben wurden mit Jodessigsäure carboxymethyliert und dann 48 h lang gegen 0,1% Ammoniumbicarbonat dialysiert. Nach dem Trocknen der Proben wurden diese mit Schweinetrypsin in 7 M Harnstoff-Puffer verdaut und die Peptide durch "Reverse-Phase" HPLC getrennt. Es konnten 2 Peptide mit den entsprechenden DNA-Sequenzen zu Flavodoxin von E. coli identifiziert werden. Durch diese Reinigungsschritte konnte Flavodoxin homogen erhalten werden.

10 3.8 Reinigung und Identifizierung von Ferredoxin (Flavodoxin)-NADP⁺-Reductase

Extrakt W wurde auf eine Anionenaustauscherchromatographie-Säule (Q-Sepharose FastFlow (Pharmacia)) aufgetragen. Diese Säule war mit 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) enthaltend 1 mM TPP äquilibriert worden. Die an der Säule gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0-1 M) eluiert. Die eluierten Protein-Fraktionen wurden vereinigt und entsprechend zu Beispiel 3.7 konzentriert, entsalzt und auf eine Mono-Q-Anionenaustauscher-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die an dieser Säule gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0-0,4 M in 20 mM Tris-Puffer) eluiert. Anschliessend wurden die vereinigten eluierten Protein-Fraktionen (wie bereits beschrieben, konzentriert und entsalzt) auf eine Superose 12 Prep.Gel-Filtrations-Chromatographie-Säule (Pharmacia; äquilibriert mit 20 mM Tris-Puffer) und dann auf eine Sephacryl HR100-Gel-Filtrations-Säule (Pharmacia; äquilibriert mit 20 mM Tris-Puffer) aufgetragen. Nach Elution mit 20 mM Tris-Puffer konnte ein weiteres Protein homogen erhalten werden (untersucht mittels SDS-PAGE). Die dieses Protein enthaltenden Fraktionen wurden analog zu dem Testsystem gemäss Beispiel 3.7 identifiziert. Biotinsynthase-Aktivität wurde nur nach Zugabe dieser Fraktionen gemessen.

35 Um von diesem Protein die N-terminale Aminosäure-Sequenz zu bestimmen, wurde das gereinigte Protein direkt sequenziert.

Das Protein hatte eine der Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase entsprechende N-terminale Aminosäuresequenz. Durch diese Reinigungsschritte konnte Ferredoxin (Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase homogen erhalten werden.

5

3.9 Anreicherung von einem oder mehreren für die Biotinsynthese-Reaktion verantwortlichen Proteinen

Die angereinigte Biotinsynthase (Beispiel 3.2) hatte mit gereinigtem Flavodoxin plus Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase und mit den notwendigen Cofaktoren sowie mit den Aminosäuren keine Biotinsynthase-Aktivität. Um Aktivität zu erreichen wurde nach einem weiteren Protein oder Proteine in der 45% Ammoniumsulfat-Fraktion gesucht.

15 Dieses Protein oder diese Proteine wurden aus dem zellfreien Extrakt W durch Ammoniumsulfat-Präzipitation bei einer Sättigung von 45% erhalten. Das erhaltene Protein-Pellet wurde in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5, enthaltend 1 mM DTT und TPP (1g/l) resuspendiert und anschliessend mit einer PD-10-Säule (Pharmacia) entsalzt. Das entsalzte Material wurde dann auf eine Anionen-Austauscher-Chromatographie-Säule (Q-Sepharose HP Hi-Load) aufgetragen, welche zuvor mit 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5, enthaltend 1 mM DTT und TPP (1g/l), äquilibriert worden war. Die Protein-Fractionen mit der gewünschten Aktivität wurden 20 mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0 mM - 600 mM NaCl) eluiert. Anschliessend wurden diese Protein-Fractionen mittels Gelfiltrations-Chromatographie (Sephacryl HR-100-Säule, Pharmacia) weiter gereinigt. Das daraus erhaltene Protein-pellet wurde in 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und 25 dann wie bereits beschrieben entsalzt. Daraus wurde eine Proteinlösung erhalten, die für den In-Vitro-Test gemäss Beispiel 3.2 eingesetzt wurde.

30

3.10 Biotinsynthese-Reaktion in Gegenwart von Flavodoxin, Ferredoxin (Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase, einem oder mehreren der für die Biotinsynthese-Reaktion verantwortlichen Proteine, einer oder mehrerer Aminosäuren und den üblichen Cofaktoren

Dem zellfreien Extrakt Z wurde Flavodoxin, Ferredoxin (Flavodoxin)NADP⁺-Reduktase und das oder die für die Biotinsynthese-Reaktion verantwortlichen Protein oder Proteine hinzugefügt. Die Zugabe von Proteinen, Cofaktoren und Aminosäuren bewirkte eine erhöhte Biotinsynthese-Aktivität (Tabelle III).

Tabelle III

15	Zusammensetzung der Tests	pmol produziertes Biotin
	Extrakt Z mit Cofaktoren und Aminosäuren	390
20	Extrakt Z + Cofaktoren + Aminosäuren + Flavodoxin + Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP ⁺ -Reduktase + einem oder mehreren der für die Biotinsynthese-Reaktion verantwortlichen Proteine	1560
25		

3.11 Biotinsynthese-Reaktion mit angereinigter Biotinsynthese in Gegenwart von Kombinationen von Flavodoxin, Ferredoxin (Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase, einem oder mehreren der für die Biotinsynthese-Reaktion verantwortlichen Proteine, einer oder mehrerer Aminosäuren und den üblichen Cofaktoren

Um den Einfluß dieser Komponenten auf die Biotinsynthese-Reaktion mit angereinigter Biotinsynthese zu testen, wurden diese einzeln oder in Kombination miteinander eingesetzt. Die

Cofaktoren wurden in der gleichen Menge wie in Beispiel 3.4 und die Aminosäuren wie in Beispiel 3.3 eingesetzt. Wenn all diese Komponenten vorhanden waren, wurde Dethiobiotin zu Biotin mit angereinigter Biotinsynthase vollständig umgewandelt. Keine Aktivität konnte gemessen werden, wenn eine dieser Komponenten fehlte. Daher werden alle diese Komponenten für Umwandlung von Dethiobiotin zu Biotin benötigt (Tabelle IV).

10

Tabelle IV

	Zusammensetzung des Tests	pmol produziertes Biotin
15	angereinigte Biotinsynthase	0
	angereinigte Biotinsynthase	800
	+ Flavodoxin + Ferredoxin(Flavodoxin)	
	NADP ⁺ Reduktase	
20	+ eines oder mehrere für die Biotinsynthase-Reaktion verantwortlichen Proteine	
	+ Cofaktoren	
	+ Aminosäuren	

25

47
SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: LONZA AG
- (B) STRASSE: Muenchensteinerstrasse 38
- (C) ORT: Basel
- (E) LAND: Schweiz
- (F) POSTLEITZAHL: 4002

(ii) ANMELDETITEL: Biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Biotin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 19

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: CH 3124/92
- (B) ANMELDEDATUM: 02-OCT-1992

(vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: CH 2134/93
- (B) ANMELDEDATUM: 15-JUL-1993

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5872 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (B) STAMM: DSM498

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pB030A-15/9

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 117..1157
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 117
/product= "Biotin Synthase"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "bioB"
/number= 1

(ix) MERKMALE:

- 48
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 2295..3050
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 2295
/function= "involved in pimeloyl-CoA synthesis"
/product= "protein"
/gene= "bioC"
/number= 3
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 3750..5039
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 3750
/EC_number= 2.6.1.62
/product= "DAPA synthase"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "bioA"
/number= 5
/standard_name= "S-Adenosyl-L-methionine:8-amino-7-oxononanoate aminotransf."
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 5098..5574
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 5098
/function= "unknown, involved in biotin synthesis"
/product= "protein"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "ORF1"
/number= 6
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: -10_signal
(B) LAGE: 45..49
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /evidence= EXPERIMENTAL
/standard_name= "promoter ptac"
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: -35_signal
(B) LAGE: 23..28
(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "promoter ptac"
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
(B) LAGE: 105..119
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /evidence= EXPERIMENTAL
/standard_name= "bioB RBS no.9"
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
(B) LAGE: 2284..2297
(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioC RBS"
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
(B) LAGE: 3742..3752
(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioA RBS"
- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS

49

(B) LAGE: 5088..5100

(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "ORF1 RBS"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLUSSEL: terminator

(B) LAGE: 5583..5644

(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "rho-independent
transcriptional terminator"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLUSSEL: stem_loop

(B) LAGE: 5583..5605

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: promoter

(B) LAGE: 1..96

(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell

(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "promoter ptac"
/evidence= EXPERIMENTAL

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTEILUNG:

(H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1

(I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986

(J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT	60
GTGAGCGGAT AACAAATTTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTC	116
ATG GCT CAC CGC CCA CGC TGG ACA TTG TCG CAA GTC ACA GAA TTA TTT	164
Met Ala His Arg Pro Arg Trp Thr Leu Ser Gln Val Thr Glu Leu Phe	
1 5 10 15	
GAA AAA CCG TTG CTG GAT CTG CTG TTT GAA GCG CAG CAG GTG CAT CGC	212
Glu Lys Pro Leu Leu Asp Leu Leu Phe Glu Ala Gln Gln Val His Arg	
20 25 30	
CAG CAT TTC GAT CCT CGT CAG GTG CAG GTC AGC ACG TTG CTG TCG ATT	260
Gln His Phe Asp Pro Arg Gln Val Gln Val Ser Thr Leu Leu Ser Ile	
35 40 45	
AAG ACC GGA GCT TGT CCG GAA GAT TGC AAA TAC TGC CCG CAA AGC TCG	308
Lys Thr Gly Ala Cys Pro Glu Asp Cys Lys Tyr Cys Pro Gln Ser Ser	
50 55 60	
CGC TAC AAA ACC GGG CTG GAA GCC GAG CGG TTG ATG GAA GTT GAA CAG	356
Arg Tyr Lys Thr Gly Leu Glu Ala Glu Arg Leu Met Glu Val Glu Gln	
65 70 75 80	
GTG CTG GAG TCG GCG CGC AAA GCG AAA GCG GCA GGA TCG ACG CGC TTC	404
Val Leu Glu Ser Ala Arg Lys Ala Lys Ala Ala Gly Ser Thr Arg Phe	
85 90 95	
TGT ATG GGC GCG GCG TGG AAG AAT CCC CAC GAA CGC GAT ATG CCG TAC	452
Cys Met Gly Ala Ala Trp Lys Asn Pro His Glu Arg Asp Met Pro Tyr	
100 105 110	
CTG GAA CAA ATG GTG CAG GGG GTA AAA GCG ATG GGG CTG GAG GCG TGT	500
Leu Glu Gln Met Val Gln Gly Val Lys Ala Met Gly Leu Glu Ala Cys	
115 120 125	
ATG ACG CTG GCG ACG TTG AGT GAA TCT CAG GCG CAG CGC CTC GCG AAC	548

Met Thr Leu Gly Thr Leu Ser Glu Ser Gln Ala Gln Arg Leu Ala Asn			50
130	135	140	
GCC GGG CTG GAT TAC TAC AAC CAC AAC CTG GAC ACC TCG CCG GAG TTT	596		
Ala Gly Leu Asp Tyr Tyr Asn His Asn Leu Asp Thr Ser Pro Glu Phe			
145	150	155	160
TAC GGC AAT ATC ATC ACC ACA CGC ACT TAT CAG GAA CGC CTC GAT ACG	644		
Tyr Gly Asn Ile Ile Thr Thr Arg Thr Tyr Gln Glu Arg Leu Asp Thr			
165	170	175	
CTG GAA AAA GTG CGC GAT GCC GGG ATC AAA GTC TGT TCT GGC GGC ATT	692		
Leu Glu Lys Val Arg Asp Ala Gly Ile Lys Val Cys Ser Gly Gly Ile			
180	185	190	
GTG GGC TTA GGC GAA ACG GTA AAA GAT CGC GCC GGA TTA TTG CTG CAA	740		
Val Gly Leu Gly Glu Thr Val Lys Asp Arg Ala Gly Leu Leu Leu Gln			
195	200	205	
CTG GCA AAC CTG CCG ACG CCG CCG GAA AGC GTG CCA ATC AAC ATG CTG	788		
Leu Ala Asn Leu Pro Thr Pro Pro Glu Ser Val Pro Ile Asn Met Leu			
210	215	220	
GTG AAG GTG AAA GGC ACG CCG CTT GCC GAT AAC GAT GAT GTC GAT GCC	836		
Val Lys Val Lys Gly Thr Pro Leu Ala Asp Asn Asp Asp Val Asp Ala			
225	230	235	240
TTT GAT TTT ATT CGC ACC ATT GCG GTC GCG CCG ATC ATG ATG CCA ACC	884		
Phe Asp Phe Ile Arg Thr Ile Ala Val Ala Arg Ile Met Met Pro Thr			
245	250	255	
TCT TAC GTG CGC CTT TCT GCC GGA CGC GAG CAG ATG AAC GAA CAG ACT	932		
Ser Tyr Val Arg Leu Ser Ala Gly Arg Glu Gln Met Asn Glu Gln Thr			
260	265	270	
CAG GCG ATG TGC TTT ATG GCA GGC GCA AAC TCG ATT TTC TAC GGT TGC	980		
Gln Ala Met Cys Phe Met Ala Gly Ala Asn Ser Ile Phe Tyr Gly Cys			
275	280	285	
AAA CTG CTG ACC ACG CCG AAT CCG GAA GAA GAT AAA GAC CTG CAA CTG	1028		
Lys Leu Leu Thr Thr Pro Asn Pro Glu Glu Asp Lys Asp Leu Gln Leu			
290	295	300	
TTC CGC AAA CTG GGG CTA AAT CCG CAG CAA ACT GCC GTG CTG GCA GGG	1076		
Phe Arg Lys Leu Gly Leu Asn Pro Gln Gln Thr Ala Val Leu Ala Gly			
305	310	315	320
GAT AAC GAA CAA CAG CAA CGT CTT GAA CAG GCG CTG ATG ACC CCG GAC	1124		
Asp Asn Glu Gln Gln Gln Arg Leu Glu Gln Ala Leu Met Thr Pro Asp			
325	330	335	
ACC GAC GAA TAT TAC AAC GCG GCA GCA TTA TGAGCTGGCA GGAGAAAATC	1174		
Thr Asp Glu Tyr Tyr Asn Ala Ala Ala Leu			
340	345		
AACGGGGCGG TCGATGCCGG GCGTGCTGCC GATGCCCTGC GTCGCGTTA TCCGGTGGCG	1234		
CAAGGAGCCG GACGCTGGCT GGTGGGGAT GATCGCCAGT ATCTGAACCT TTCCAGTAAC	1294		
GATTATTAG GTTTAAGCCA TCATCCGCAA ATTATCCGTG CCTGGCAGCA GGGGGCGGAG	1354		
CAATTGGCA TCGGTAGCGG CGGCTCCGT CACGTCAGCG GTTAGAGCT GGTGCATCAG	1414		
GCACCTGGAAG AAGAGCTGGC CGAGTGGCTT GGCTATTGCG GGGCACTGCT GTTTATCTCT	1474		

GGTTTCGCCG CTAATCAGGC AGTTATTGCC GCGATGATGG CGAAAGAGGA CCGTAATTGCT	1534
GCGACCGGC TTAGCCATGC CTCATTGCTG GAAGCTGCCA GTTTAAGCCC GTCGCAGCTT	1594
CGCCGTTTTG CTCATAACGA TGCACTCAT TTGGCGGAT TGCTTGCTTC CCCCTGTCCG	1654
GGGCAGCAAA TGGTGGTGAC AGAAGGCGTG TTCAGCATGG ACGGCGATAG TCGGCCACTG	1714
GCGGAAATCC AGCAGGTAAC GCAACAGCAC AATGGCTGGT TGATGGTCGA TGATGCCAC	1774
GGCAGGGCG TTATCGGGGA GCAGGGGCGC GGCAGCTGCT GGCTGCAAAA GGTAAACCA	1834
GAATTGCTGG TAGTGACTTT TGGCAAAGGA TTTGGCTCA GCGGGGCGC GGTGCTTTGC	1894
TCCAGTACGG TGGCGGATTA TCTGCTGCAA TTGCGCCGCC ACCTTATCTA CAGCACCAGT	1954
ATGCCGCCCG CTCAGGCGCA GGCATTACGT GCGTCGCTGG CCGTCATTGG CAGTGATGAG	2014
GGTGATGCAC GCGCGCAAAA ACTGGGCGCA CTCATTACGC GTTTTCGTGC CGGAGTACAG	2074
GATTTGCCGT TTACGCTTGC TGATTTCATGC AGCGCCATCC AGCCATTGAT TGTCGGTGAT	2134
AACAGCCGTG CGTTACAAC TGCAGAAAA CTGCSTCAGC AAGGCTGCTG GGTACGGCG	2194
ATTGCGCCGC CAACCGTACC CGCTGGTACT GCGGACTGC GCTTAACGCT AACCGCTGCG	2254
CATGAAATGC AGSATATCGA CCGTCTGCTG GAGGTGCTGC ATG GCA ACG GTT AAT	2309
Met Ala Thr Val Asn	
1 5	
AAA CAA GCC ATT GCA GCG GCA TTT GGT CGG GCA GCC GCA CAC TAT GAG	2357
Lys Gln Ala Ile Ala Ala Ala Phe Gly Arg Ala Ala Ala His Tyr Glu	
10 15 20	
CAA CAT GCA GAT CTA CAG CGC CAG AGT GCT GAC GCC TTA CTG GCA ATG	2405
Gln His Ala Asp Leu Gln Arg Gln Ser Ala Asp Ala Leu Leu Ala Met	
25 30 35	
CTT CCA CAG CGT AAA TAC ACC CAC GTA CTG GAC GCG GGT TGT GGA CCT	2453
Leu Pro Gln Arg Lys Tyr Thr His Val Leu Asp Ala Gly Cys Gly Pro	
40 45 50	
GGC TGG ATG AGC CGC CAC TGG CGG GAA CGT CAC GCG CAG GTG ACG GCC	2501
Gly Trp Met Ser Arg His Trp Arg Glu Arg His Ala Gln Val Thr Ala	
55 60 65	
TTA GAT CTC TCG CCG CCA ATG CTT GTT CAG GCA CGC CAG AAG GAT GCC	2549
Leu Asp Leu Ser Pro Pro Met Leu Val Gln Ala Arg Gln Lys Asp Ala	
70 75 80 85	
GCA GAC CAT TAT CTG GCG GGA GAT ATC GAA TCC CTG CCG TTA GCG ACT	2597
Ala Asp His Tyr Leu Ala Gly Asp Ile Glu Ser Leu Pro Leu Ala Thr	
90 95 100	
GCG ACG TTC GAT CTT GCA TGG AGC AAT CTC GCA GTG CAG TGG TGC GGT	2645
Ala Thr Phe Asp Leu Ala Trp Ser Asn Leu Ala Val Gln Trp Cys Gly	
105 110 115	
AAT TTA TCC ACG GCA CTC CGC GAG CTG TAT CGG GTG GTG CGC CCC AAA	2693
Asn Leu Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Arg Val Val Arg Pro Lys	
120 125 130	
GGC GTG GTC GCG TTT ACC ACG CTG GTG CAG GGA TCG TTA CCC GAA CTG	2741

52

Gly Val Val Ala Phe Thr Thr Leu Val Gln Gly Ser Leu Pro Glu Leu	
135 140 145	
CAT CAG GCG TGG CAG GCG GTG GAC GAG CGT CCG CAT GCT AAT CGC TTT	2789
His Gln Ala Trp Gln Ala Val Asp Glu Arg Pro His Ala Asn Arg Phe	
150 155 160 165	
TTA CCG CCA GAT GAA ATC GAA CAG TCG CTG AAC GGC GTG CAT TAT CAA	2837
Leu Pro Pro Asp Glu Ile Glu Gln Ser Leu Asn Gly Val His Tyr Gln	
170 175 180	
CAT CAT ATT CAG CCC ATC ACG CTG TGG TTT GAT GAT GCG CTC AGT GCC	2885
His His Ile Gln Pro Ile Thr Leu Trp Phe Asp Asp Ala Ser Ala	
185 190 195	
ATG CGT TCG CTG AAA GGC ATC GGT GCC ACG CAT CTT CAT GAA GGG CGC	2933
Met Arg Ser Leu Lys Gly Ile Gly Ala Thr His Leu His Glu Gly Arg	
200 205 210	
GAC CCG CGA ATA TTA ACG CGT TCG CAG TTG CAG CGA TTG CAA CTG GCC	2981
Asp Pro Arg Ile Leu Thr Arg Ser Gln Leu Gln Arg Leu Gln Leu Ala	
215 220 225	
TGG CCG CAA CAG CAG GGG CGA TAT CCT CTG ACG TAT CAT CTT TTT TTG	3029
Trp Pro Gln Gln Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Thr Tyr His Leu Phe Leu	
230 235 240 245	
GGA GTG ATT GCT CGT GAG TAAACGTTAT TTTGTCACCG GAACGGATAC	3077
Gly Val Ile Ala Arg Glu	
250	
CGAAGTGGGG AAAACTGTGC CCAGTTGTGC ACTTTTACAA GCGCAAAGG CAGCAGGCTA	3137
CGGACGGCA GGTATAAAC CGGTGCGCTC TGGCAGCGAA AAGACCCCGG AAGGTTTACG	3197
CAATAGCGAC GCGCTGGCGT TACAGCGCAA CAGCAGCCTG CAGCTGGATT ACGCAACAGT	3257
AAATCCTTAC ACCTTGSCAG AACCCACTTC GCCGCACATC ATCAGCGCGC AAGAGGGCAG	3317
ACCGATAGAA TCATTGGTAA TGAGCGCGG ATTACGCGCG CTTGAACAAC AGGCTGACTG	3377
GGTGTTAGTG GAAGGTGCTG GCGGCTGGTT TACGCCGCTT TCTGACACTT TCACTTTTGC	3437
AGATTGGSTA ACACAGGAAC AACTGCCGT GATACTGSTA GTTGGTGTGA AACTCGGCTG	3497
TATTAATCAC GCGATGTTGA CTGCACAGST AATACAACAC GCCGGACTGA CTCTGGCGGG	3557
TTGGGTGGCG AACGATGTTA CGCCTCCGGG AAAACGTCAC GCTGAATATA TGACCACGCT	3617
CACCGCATG ATTCCCGCGC CGCTGCTGGG AGAGATCCCC TGGCTTGACG AAAATCCAGA	3677
AAATGCGGCA ACCGGAAAGT ACATAAACCT TGCCTTCGTC GACGCGTCGA CTCTAGGGTT	3737
TACAAGTCGA TT ATG ACA ACG GAC GAT CTT GCC TTT GAC CAA CGC CAT	3785
Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe Asp Gln Arg His	
1 5 10	
ATC TGG CAC CCA TAC ACA TCC ATG ACC TCC CCT CTG CCG GTT TAT CCG	3833
Ile Trp His Pro Tyr Thr Ser Met Thr Ser Pro Leu Pro Val Tyr Pro	
15 20 25	
GTG GTG AGC GCC GAA GGT TGC GAG CTG ATT TTG TCT GAC GGC AGA CGC	3881
Val Val Ser Ala Glu Gly Cys Glu Leu Ile Leu Ser Asp Gly Arg Arg	
30 35 40	

53

CTG GTT GAC GGT ATG TCG TCC TGG TGG GCG GCG ATC CAC GGC TAC AAT Leu Val Asp Gly Met Ser Ser Trp Trp Ala Ala Ile His Gly Tyr Asn 45 50 55 60	3929
CAC CCG CAG CTT AAT GCG GCG ATG AAG TCG CAA ATT GAT GCC ATG TCG His Pro Gln Leu Asn Ala Ala Met Lys Ser Gln Ile Asp Ala Met Ser 65 70 75	3977
CAT GTG ATG TTT GGC GGT ATC ACC CAT GCG CCA GCC ATT GAG CTG TGC His Val Met Phe Gly Gly Ile Thr His Ala Pro Ala Ile Glu Leu Cys 80 85 90	4025
CGC AAA CTG GTG GCG ATG ACG CCG CAA CCG CTG GAG TGC GTT TTT CTC Arg Lys Leu Val Ala Met Thr Pro Gln Pro Leu Glu Cys Val Phe Leu 95 100 105	4073
GCG GAC TCC GGT TCC GTA GCG GTG GAA GTG GCG ATG AAA ATG GCG TTG Ala Asp Ser Gly Ser Val Ala Val Glu Val Ala Met Lys Met Ala Leu 110 115 120	4121
CAG TAC TGG CAA GCC AAA GGC GAA GCG CCG CAG CGT TTT CTG ACC TTC Gln Tyr Trp Gln Ala Lys Gly Glu Ala Arg Gln Arg Phe Leu Thr Phe 125 130 135 140	4169
CGC AAT GGT TAT CAT GGC GAT ACC TTT GCG GCG ATG TCG GTG TGC GAT Arg Asn Gly Tyr His Gly Asp Thr Phe Gly Ala Met Ser Val Cys Asp 145 150 155	4217
CCG GAT AAC TCA ATG CAC AGT CTG TGG AAA GGC TAC CTG CCA GAA AAC Pro Asp Asn Ser Met His Ser Leu Trp Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Asn 160 165 170	4265
CTG TTT GCT CCC GCC CCG CAA AGC CCG ATG GAT GGC GAA TGG GAT GAG Leu Phe Ala Pro Ala Pro Gln Ser Arg Met Asp Gly Glu Trp Asp Glu 175 180 185	4313
CGC GAT ATG GTG GGC TTT GCC CCG CTG ATG GCG GCG CAT CGT CAT GAA Arg Asp Met Val Gly Phe Ala Arg Leu Met Ala Ala His Arg His Glu 190 195 200	4361
ATC GCG GCG GTG ATC ATT GAG CCG ATT GTC CAG GGC GCA GGC GGG ATG Ile Ala Ala Val Ile Ile Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met 205 210 215 220	4409
CGC ATG TAC CAT CCG GAA TGG TTA AAA CGA ATC CCG AAA ATA TGC GAT Arg Met Tyr His Pro Glu Trp Leu Lys Arg Ile Arg Lys Ile Cys Asp 225 230 235	4457
CGC GAA GGT ATC TTG CTG ATT GCC GAC GAG ATC GCC ACT GGA TTT GGT Arg Glu Gly Ile Leu Leu Ile Ala Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly 240 245 250	4505
CGT ACC GGG AAA CTG TTT GCC TGT GAA CAT GCA GAA ATC GCG CCG GAC Arg Thr Gly Lys Leu Phe Ala Cys Glu His Ala Glu Ile Ala Pro Asp 255 260 265	4553
ATT TTG TGC CTC GGT AAA GCC TTA ACC GGC GGC ACA ATG ACC CTT TCC Ile Leu Cys Leu Gly Lys Ala Leu Thr Gly Gly Thr Met Thr Leu Ser 270 275 280	4601
GCC ACA CTC ACC ACG CCG GAG GTT GCA GAA ACC ATC AGT AAC GGT GAA Ala Thr Leu Thr Thr Arg Glu Val Ala Glu Thr Ile Ser Asn Gly Glu 285 290 295 300	4649

54

GCC GGT TGC TTT ATG CAT GGG CCA ACT TTT ATG GGC AAT CCG CTG GCC Ala Gly Cys Phe Met His Gly Pro Thr Phe Met Gly Asn Pro Leu Ala 305 310 315	4697
TGC GCG GCA GCA AAC GCC AGC CTG GCG ATT CTC GAA TCT GGC GAC TGG Cys Ala Ala Ala Asn Ala Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Gly Asp Trp 320 325 330	4745
CAG CAA CAG GTG GCG GAT ATT GAA GTA CAG CTG CGC GAG CAA CTT GCC Gln Gln Gln Val Ala Asp Ile Glu Val Gln Leu Arg Glu Gln Leu Ala 335 340 345	4793
CCC GCC CGT GAT GCC GAA ATG GTT GCC GAT GTG CGC GTA CTG GGG GCC Pro Ala Arg Asp Ala Glu Met Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala 350 355 360	4841
ATT GGC GTG GTC GAA ACC ACT CAT CCG GTG AAT ATG GCG GCG CTG CAA Ile Gly Val Val Glu Thr Thr His Pro Val Asn Met Ala Ala Leu Gln 365 370 375 380	4889
AAA TTC TTT GTC GAA CAG GGT GTC TGG ATC CGG CCT TTT GGC AAA CTG Lys Phe Phe Val Glu Gln Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Lys Leu 385 390 395	4937
ATT TAC CTG ATG CCG CCC TAT ATT ATT CTC CCG CAA CAG TTG CAG CGT Ile Tyr Leu Met Pro Pro Tyr Ile Ile Leu Pro Gln Gln Leu Gln Arg 400 405 410	4985
CTG ACC GCA GCG GTT AAC CCG GCG GTA CAG GAT GAA ACA TTT TTT TGC Leu Thr Ala Ala Val Asn Arg Ala Val Gln Asp Glu Thr Phe Phe Cys 415 420 425	5033
CAA TAAAGAGAAG TCCGCGTGAG GGTTCCTGGC TACACTTTCT GCAAACAAGA Gln 430	5086
AAGGAGGGTT C ATG AAA CTC ATC AGT AAC GAT CTG CCG GAT GGC GAT AAA Met Lys Leu Ile Ser Asn Asp Leu Arg Asp Gly Asp Lys 1 5 10	5136
TTG CCG CAT CGT CAT GTC TTT AAC GGC ATG GGT TAC GAT GGC GAT AAT Leu Pro His Arg His Val Phe Asn Gly Met Gly Tyr Asp Gly Asp Asn 15 20 25	5184
ATT TCA CCG CAT CTG GCG TGG GAT GAT GTT CCT GCG GGA ACG AAA AGT Ile Ser Pro His Leu Ala Trp Asp Asp Val Pro Ala Gly Thr Lys Ser 30 35 40 45	5232
TTT GTT GTC ACC TGC TAC GAC CCG GAT GCG CCA ACC GGC TCC GGC TGG Phe Val Val Thr Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Pro Thr Gly Ser Gly Trp 50 55 60	5280
TGG CAC TGG GTA GTT GTT AAC TTA CCC GCT GAT ACC CCG GTA TTA CCG Trp His Trp Val Val Val Asn Leu Pro Ala Asp Thr Arg Val Leu Pro 65 70 75	5328
CAA GGG TTT GGC TCT GGT CTG GTA GCA ATG CCA GAC GGC GTT TTG CAG Gln Gly Phe Gly Ser Gly Leu Val Ala Met Pro Asp Gly Val Leu Gln 80 85 90	5376
ACG CGT ACC GAC TTT GGT AAA ACC GGG TAC GAT GGC GCA GCA CCG CCG Thr Arg Thr Asp Phe Gly Lys Thr Gly Tyr Asp Gly Ala Ala Pro Pro 95 100 105	5424

55

AAA GGC GAA ACT CAT CGC TAC ATT TTT ACC GTT CAC GCG CTG GAT ATA 5472
 Lys Gly Glu Thr His Arg Tyr Ile Phe Thr Val His Ala Leu Asp Ile
 110 115 120 125

 GAA CGT ATT GAT GTC GAT GAA GGT GCC AGC GGC GCG ATG GTC GGG TTT 5520
 Glu Arg Ile Asp Val Asp Glu Gly Ala Ser Gly Ala Met Val Gly Phe
 130 135 140

 AAC GTT CAT TTC CAC TCT CTG GCA AGC GCC TCG ATT ACT GCG ATG TTT 5568
 Asn Val His Phe His Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ile Thr Ala Met Phe
 145 150 155

 AGT TAATCACTCT GCCAGATGGC GCAATGCCAT CTGGTATCAC TTAAGGTAT 5621
 Ser

 TAAAAACAAC TTTTGTCTT TTTACCTTCC CGTTTCGCTC AAGTTAGTAT AAAAAAGCAG 5681
 GCTTCAACGG ATTCATTTT CTATTTTATA GCGCGSAGCA ACCTGTGAAC ACATTTTCAG 5741
 TTTCGGTCT GCGCGTGSCA TTGGCTTTTG GCGTGACGCT GACCGCTGT AGCTCAACCC 5801
 CGCCCGATCA ACGTCTTCT GATCAAACCG CGCCTGGTAC CGAGCTCGAA TTCCTGCAGG 5861
 CATGCAAGCT T 5872

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LANGE: 346 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ala His Arg Pro Arg Trp Thr Leu Ser Gln Val Thr Glu Leu Phe
 1 5 10 15

 Glu Lys Pro Leu Leu Asp Leu Leu Phe Glu Ala Gln Gln Val His Arg
 20 25 30

 Gln His Phe Asp Pro Arg Gln Val Gln Val Ser Thr Leu Leu Ser Ile
 35 40 45

 Lys Thr Gly Ala Cys Pro Glu Asp Cys Lys Tyr Cys Pro Gln Ser Ser
 50 55 60

 Arg Tyr Lys Thr Gly Leu Glu Ala Glu Arg Leu Met Glu Val Glu Gln
 65 70 75 80

 Val Leu Glu Ser Ala Arg Lys Ala Lys Ala Ala Gly Ser Thr Arg Phe
 85 90 95

 Cys Met Gly Ala Ala Trp Lys Asn Pro His Glu Arg Asp Met Pro Tyr
 100 105 110

 Leu Glu Gln Met Val Gln Gly Val Lys Ala Met Gly Leu Glu Ala Cys
 115 120 125

 Met Thr Leu Gly Thr Leu Ser Glu Ser Gln Ala Gln Arg Leu Ala Asn

56

130	135	140
Ala Gly Leu Asp Tyr Tyr Asn His Asn Leu Asp Thr Ser Pro Glu Phe		
145	150	155 160
Tyr Gly Asn Ile Ile Thr Thr Arg Thr Tyr Gln Glu Arg Leu Asp Thr		
165	170	175
Leu Glu Lys Val Arg Asp Ala Gly Ile Lys Val Cys Ser Gly Gly Ile		
180	185	190
Val Gly Leu Gly Glu Thr Val Lys Asp Arg Ala Gly Leu Leu Leu Gln		
195	200	205
Leu Ala Asn Leu Pro Thr Pro Pro Glu Ser Val Pro Ile Asn Met Leu		
210	215	220
Val Lys Val Lys Gly Thr Pro Leu Ala Asp Asn Asp Asp Val Asp Ala		
225	230	235 240
Phe Asp Phe Ile Arg Thr Ile Ala Val Ala Arg Ile Met Met Pro Thr		
245	250	255
Ser Tyr Val Arg Leu Ser Ala Gly Arg Glu Gln Met Asn Glu Gln Thr		
260	265	270
Gln Ala Met Cys Phe Met Ala Gly Ala Asn Ser Ile Phe Tyr Gly Cys		
275	280	285
Lys Leu Leu Thr Thr Pro Asn Pro Glu Glu Asp Lys Asp Leu Gln Leu		
290	295	300
Phe Arg Lys Leu Gly Leu Asn Pro Gln Gln Thr Ala Val Leu Ala Gly		
305	310	315 320
Asp Asn Glu Gln Gln Gln Arg Leu Glu Gln Ala Leu Met Thr Pro Asp		
325	330	335
Thr Asp Glu Tyr Tyr Asn Ala Ala Ala Leu		
340	345	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
- (A) LANGE: 251 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear.

(11) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Ala Thr Val Asn Lys Gln Ala Ile Ala Ala Ala Phe Gly Arg Ala		
1	5	10 15
Ala Ala His Tyr Glu Gln His Ala Asp Leu Gln Arg Gln Ser Ala Asp		
20	25	30
Ala Leu Leu Ala Met Leu Pro Gln Arg Lys Tyr Thr His Val Leu Asp		
35	40	45
Ala Gly Cys Gly Pro Gly Trp Met Ser Arg His Trp Arg Glu Arg His		

57

50	55	60
Ala Gln Val Thr Ala Leu Asp Leu Ser Pro Pro Met Leu Val Gln Ala		
65	70	75
Arg Gln Lys Asp Ala Ala Asp His Tyr Leu Ala Gly Asp Ile Glu Ser		
85	90	95
Leu Pro Leu Ala Thr Ala Thr Phe Asp Leu Ala Trp Ser Asn Leu Ala		
100	105	110
Val Gln Trp Cys Gly Asn Leu Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Arg		
115	120	125
Val Val Arg Pro Lys Gly Val Val Ala Phe Thr Thr Leu Val Gln Gly		
130	135	140
Ser Leu Pro Glu Leu His Gln Ala Trp Gln Ala Val Asp Glu Arg Pro		
145	150	155
His Ala Asn Arg Phe Leu Pro Pro Asp Glu Ile Glu Gln Ser Leu Asn		
165	170	175
Gly Val His Tyr Gln His His Ile Gln Pro Ile Thr Leu Trp Phe Asp		
180	185	190
Asp Ala Leu Ser Ala Met Arg Ser Leu Lys Gly Ile Gly Ala Thr His		
195	200	205
Leu His Glu Gly Arg Asp Pro Arg Ile Leu Thr Arg Ser Gln Leu Gln		
210	215	220
Arg Leu Gln Leu Ala Trp Pro Gln Gln Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Thr		
225	230	235
Tyr His Leu Phe Leu Gly Val Ile Ala Arg Glu		
245	250	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 429 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKULS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe Asp Gln Arg His Ile Trp His Pro		
1	5	10
Tyr Thr Ser Met Thr Ser Pro Leu Pro Val Tyr Pro Val Val Ser Ala		
20	25	30
Glu Gly Cys Glu Leu Ile Leu Ser Asp Gly Arg Arg Leu Val Asp Gly		
35	40	45
Met Ser Ser Trp Trp Ala Ala Ile His Gly Tyr Asn His Pro Gln Leu		
50	55	60
Asn Ala Ala Met Lys Ser Gln Ile Asp Ala Met Ser His Val Met Phe		

58

65 70 75 80

Gly Gly Ile Thr His Ala Pro Ala Ile Glu Leu Cys Arg Lys Leu Val
85 90 95

Ala Met Thr Pro Gln Pro Leu Glu Cys Val Phe Leu Ala Asp Ser Gly
100 105 110

Ser Val Ala Val Glu Val Ala Met Lys Met Ala Leu Gln Tyr Trp Gln
115 120 125

Ala Lys Gly Glu Ala Arg Gln Arg Phe Leu Thr Phe Arg Asn Gly Tyr
130 135 140

His Gly Asp Thr Phe Gly Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Asp Asn Ser
145 150 155 160

Met His Ser Leu Trp Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Asn Leu Phe Ala Pro
165 170 175

Ala Pro Gln Ser Arg Met Asp Gly Glu Trp Asp Glu Arg Asp Met Val
180 185 190

Gly Phe Ala Arg Leu Met Ala Ala His Arg His Glu Ile Ala Ala Val
195 200 205

Ile Ile Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Met Tyr His
210 215 220

Pro Glu Trp Leu Lys Arg Ile Arg Lys Ile Cys Asp Arg Glu Gly Ile
225 230 235 240

Leu Leu Ile Ala Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Lys
245 250 255

Leu Phe Ala Cys Glu His Ala Glu Ile Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu
260 265 270

Gly Lys Ala Leu Thr Gly Gly Thr Met Thr Leu Ser Ala Thr Leu Thr
275 280 285

Thr Arg Glu Val Ala Glu Thr Ile Ser Asn Gly Glu Ala Gly Cys Phe
290 295 300

Met His Gly Pro Thr Phe Met Gly Asn Pro Leu Ala Cys Ala Ala Ala
305 310 315 320

Asn Ala Ser Leu Ala Ile Leu Glu Ser Gly Asp Trp Gln Gln Gln Val
325 330 335

Ala Asp Ile Glu Val Gln Leu Arg Glu Gln Leu Ala Pro Ala Arg Asp
340 345 350

Ala Glu Met Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Val
355 360 365

Glu Thr Thr His Pro Val Asn Met Ala Ala Leu Gln Lys Phe Phe Val
370 375 380

Glu Gln Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Lys Leu Ile Tyr Leu Met
385 390 395 400

Pro Pro Tyr Ile Ile Leu Pro Gln Gln Leu Gln Arg Leu Thr Ala Ala
405 410 415

59

Val Asn Arg Ala Val Gln Asp Glu Thr Phe Phe Cys Gln
420 425

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 158 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Lys Leu Ile Ser Asn Asp Leu Arg Asp Gly Asp Lys Leu Pro His
1 5 10 15

Arg His Val Phe Asn Gly Met Gly Tyr Asp Gly Asp Asn Ile Ser Pro
20 25 30

His Leu Ala Trp Asp Asp Val Pro Ala Gly Thr Lys Ser Phe Val Val
35 40 45

Thr Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Pro Thr Gly Ser Gly Trp Trp His Trp
50 55 60

Val Val Val Asn Leu Pro Ala Asp Thr Arg Val Leu Pro Gln Gly Phe
65 70 75 80

Gly Ser Gly Leu Val Ala Met Pro Asp Gly Val Leu Gln Thr Arg Thr
85 90 95

Asp Phe Gly Lys Thr Gly Tyr Asp Gly Ala Ala Pro Pro Lys Gly Glu
100 105 110

Thr His Arg Tyr Ile Phe Thr Val His Ala Leu Asp Ile Glu Arg Ile
115 120 125

Asp Val Asp Glu Gly Ala Ser Gly Ala Met Val Gly Phe Asn Val His
130 135 140

Phe His Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ile Thr Ala Met Phe Ser
145 150 155

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 5872 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(B) STAMM: DSM498

60

(vi) UNMITTELBARE HERKUNFT
(B) CLON: pB030A15-9

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 1154..2308
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 1154
/EC_number= 2.3.1.47
/product= "KAPA synthase"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "bioF"
/number= 2
/standard_name= "8-Amino-7-oxononanoate synthase"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 3043..3753
(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 3043
/EC_number= 6.3.3.3
/product= "DTB Synthase"
/evidence= EXPERIMENTAL
/gene= "bioD"
/number= 4
/standard_name= "Dethiobiotin Synthase"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
(B) LAGE: 1141..1156
(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioF RBS"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
(B) LAGE: 3030..3045
(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioD RBS"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

(H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1
(I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986
(J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT      60
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTCATGG      120
CTCACC GCCC ACGCTGGACA TTGTCGCAAG TCACAGAATT ATTTGAAAAA CCGTTGCTGG      180
ATCTGCTGTT TGAAGCGCAG CAGGTGCATC GCCAGCATTT CGATCCTCGT CAGGTGCAGG      240
TCAGCACGTT GCTGTGCGATT AAGACCGGAG CTTGTCCGGA AGATTGCAAA TACTGCCCGC      300
AAAGCTCGCG CTACAAAACC GGGCTGGAAG CCGAGCGGTT GATGGAAGTT GAACAGGTGC      360
TGGAGTGGCG GCGCAAAGCG AAAGCGGCAG GATCGACGCG CTTCTGTATG GCGCGGGCGT      420
GGAAGAATCC CCACGAACGC GATATGCCGT ACCTGGAACA AATGGTCAG GGGGTAAAAG      480
CGATGGGGCT GGAGGCGTGT ATGACGCTGG GCACGTTGAG TGAATCTCAG GCCCAGCGCC      540
TCGCGAACGC CGGGCTGGAT TACTACAACC ACAACCTGGA CACCTCGCCG GAGTTTTCAG      600

```

61

GCAATATCAT CACCACACGC ACTTATCAGG AACGCCTCGA TACGCTGGAA AAAGTGCGCC	660
ATGCCGGGAT CAAAGTCTGT TCTGGCGGCA TTGTGGGCTT AGGCGAAACG GTAAAAGATC	720
GGCGCGGATT ATTGCTGCAA CTGGCAAACC TGCCGACGCC GCGGAAAGC GTGCCAATCA	780
ACATGCTGGT GAAGGTGAAA GGCACGCCGC TTGCCGATAA CGATGATGTC GATGCCCTTG	840
ATTTTATTCG CACCATTGCG GTCGCGGGCA TCATGATGCC AACCTCTTAC GTGCGCCTTT	900
CTGCGGACG CGAGCAGATG AACGAACAGA CTCAGGCGAT GTGCTTTATG GCAGGCGCAA	960
ACTCGATTTT CTACGGTTGC AAAGTCTGA CCACGCCGAA TCCGGAAGAA GATAAAGACC	1020
TGCAACTGTT CCGCAAACTG GGGCTAAATC CGCAGCAAAC TGCCGTGCTG GCAGGGGATA	1080
ACGAACAACA GCAACGTCTT GAACAGGCGC TGATGACCCC GGACACCGAC GAATATTACA	1140
ACGCGGCAGC ATT ATG AGC TGG CAG GAG AAA ATC AAC GCG GCG CTC GAT	1189
Met Ser Trp Gln Glu Lys Ile Asn Ala Ala Leu Asp	
1 5 10	
GCG CGG CGT GCT GCC GAT GCC CTG CGT CGC CGT TAT CCG GTG GCG CAA	1237
Ala Arg Arg Ala Ala Asp Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro Val Ala Gln	
15 20 25	
GGA GCC GGA CGC TGG CTG GTG GCG GAT GAT CGC CAG TAT CTG AAC TTT	1285
Gly Ala Gly Arg Trp Leu Val Ala Asp Asp Arg Gln Tyr Leu Asn Phe	
30 35 40	
TCC AGT AAC GAT TAT TTA GGT TTA AGC CAT CAT CCG CAA ATT ATC CGT	1333
Ser Ser Asn Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His His Pro Gln Ile Ile Arg	
45 50 55 60	
GCC TGG CAG CAG GGG GCG GAG CAA TTT GGC ATC GGT AGC GGC GGC TCC	1381
Ala Trp Gln Gln Gly Ala Glu Gln Phe Gly Ile Gly Ser Gly Gly Ser	
65 70 75	
GGT CAC GTC AGC GGT TAT AGC GTG GTG CAT CAG GCA CTG GAA GAA GAG	1429
Gly His Val Ser Gly Tyr Ser Val Val His Gln Ala Leu Glu Glu Glu	
80 85 90	
CTG GCC GAG TGG CTT GGC TAT TCG CGG GCA CTG CTG TTT ATC TCT GGT	1477
Leu Ala Glu Trp Leu Gly Tyr Ser Arg Ala Leu Leu Phe Ile Ser Gly	
95 100 105	
TTT GCC GCT AAT CAG GCA GTT ATT GCC GCG ATG ATG GCG AAA GAG GAC	1525
Phe Ala Ala Asn Gln Ala Val Ile Ala Ala Met Met Ala Lys Glu Asp	
110 115 120	
CGT ATT GCT GGC GAC CGG CTT AGC CAT GCC TCA TTG CTG GAA GCT GCC	1573
Arg Ile Ala Ala Asp Arg Leu Ser His Ala Ser Leu Leu Glu Ala Ala	
125 130 135 140	
AGT TTA AGC CCG TCG CAG CTT CGC CGT TTT GCT CAT AAC GAT GTC ACT	1621
Ser Leu Ser Pro Ser Gln Leu Arg Arg Phe Ala His Asn Asp Val Thr	
145 150 155	
CAT TTG GCG CGA TTG CTT GCT TCC CCC TGT CCG GGG CAG CAA ATG GTG	1669
His Leu Ala Arg Leu Leu Ala Ser Pro Cys Pro Gly Gln Gln Met Val	
160 165 170	
GTG ACA GAA GGC GTG TTC AGC ATG GAC GGC GAT AGT GCG CCA CTG GCG	1717
Val Thr Glu Gly Val Phe Ser Met Asp Gly Asp Ser Ala Pro Leu Ala	

62		
175	180	185
GAA ATC CAG CAG GTA ACG CAA CAG CAC AAT GGC TGG TTG ATG GTC GAT Glu Ile Gln Gln Val Thr Gln Gln His Asn Gly Trp Leu Met Val Asp 190	195	200
GAT GCC CAC GGC ACG GGC GTT ATC GGG GAG CAG GGG CGC GGC AGC TGC Asp Ala His Gly Thr Gly Val Ile Gly Glu Gln Gly Arg Gly Ser Cys 205	210	215 220
TGG CTG CAA AAG GTA AAA CCA GAA TTG CTG GTA GTG ACT TTT GGC AAA Trp Leu Gln Lys Val Lys Pro Glu Leu Leu Val Val Thr Phe Gly Lys 225	230	235
GGA TTT GGC GTC AGC GGG GCA GCG GTG CTT TGC TCC AGT ACG GTG GCG Gly Phe Gly Val Ser Gly Ala Ala Val Leu Cys Ser Ser Thr Val Ala 240	245	250
GAT TAT CTG CTG CAA TTC GCC CGC CAC CTT ATC TAC AGC ACC AGT ATG Asp Tyr Leu Leu Gln Phe Ala Arg His Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Met 255	260	265
CCG CCC GCT CAG GCG CAG GCA TTA CGT GCG TCG CTG GCG GTC ATT CGC Pro Pro Ala Gln Ala Gln Ala Leu Arg Ala Ser Leu Ala Val Ile Arg 270	275	280
AGT GAT GAG GGT GAT GCA CGG CGC GAA AAA CTG GCG GCA CTC ATT ACG Ser Asp Glu Gly Asp Ala Arg Arg Glu Lys Leu Ala Ala Leu Ile Thr 285	290	295 300
CGT TTT CGT GCC GGA GTA CAG GAT TTG CCG TTT ACG CTT GCT GAT TCA Arg Phe Arg Ala Gly Val Gln Asp Leu Pro Phe Thr Leu Ala Asp Ser 305	310	315
TGC AGC GCC ATC CAG CCA TTG ATT GTC GGT GAT AAC AGC CGT GCG TTA Cys Ser Ala Ile Gln Pro Leu Ile Val Gly Asp Asn Ser Arg Ala Leu 320	325	330
CAA CTG GCA GAA AAA CTG CGT CAG CAA GGC TGC TGG GTC ACG GCG ATT Gln Leu Ala Glu Lys Leu Arg Gln Gln Gly Cys Trp Val Thr Ala Ile 335	340	345
CGC CCG CCA ACC GTA CCC GCT GGT ACT GCG CGA CTG CGC TTA ACG CTA Arg Pro Pro Thr Val Pro Ala Gly Thr Ala Arg Leu Arg Leu Thr Leu 350	355	360
ACC GCT GCG CAT GAA ATG CAG GAT ATC GAC CGT CTG CTG GAG GTG CTG Thr Ala Ala His Glu Met Gln Asp Ile Asp Arg Leu Leu Glu Val Leu 365	370	375 380
CAT GGC AAC GGT TAATAAACAA GCCATTGCAG CGGCATTGG TCGGGCAGCC His Gly Asn Gly 385		
GCACACTATG AGCAACATGC AGATCTACAG CGCCAGAGTG CTGACGCCTT ACTGGCAATG 2405		
CTTCACAGC GTAAATACAC CCACGTACTG GACGGGGTT GTGGACCTGG CTGGATGAGE 2465		
CGCCACTGGC GGGAACTGCA CGCGCAGGTG ACGGCCTTAG ATCTCTCGCC GCCAATGCTT 2525		
GTTCAGGCAC GCCAGAAGGA TGCGCAGAC CATTATCTGG CGGGAGATAT CGAATCCCTG 2585		
CCGTIAGCGA CTGCGACGTT CGATCTTGCA TGGAGCAATC TCGCAGTGCA GTGGTGCCCT 2645		

63

AATTATCCA CGGCACTCCG CGAGCTGTAT CGGGTGGTGC GCCCAAGG CGTGGTCGGC	2705
TTTACCACGC TGGTGCAGGG ATCGTTACCC GAACTGCATC AGCGGTGGCA GCGGTGGAC	2765
GAGCGTCCGC ATGCTAATCG CTTTTTACCG CCAGATGAAA TCGAACAGTC GCTGAACGGC	2825
GTGCATTATC AACATCATAT TCAGCCCATC ACGCTGTGGT TTGATGATGC GCTCAGTGCC	2885
ATGCGTTCCG TGAAAGGCAT CGGTGCCACG CATCTTCATG AAGGGCGCGA CCCGCGAATA	2945
TTAAGCGGTT CGCAGTTGCA GCGATTGCAA CTGGCCTGGC CGCAACAGCA GGGGCGATAT	3005
CCTCTGACGT ATCATCTTTT TTGGGAGTG ATTGCTC GTG AGT AAA CGT TAT TTT	3060
Val Ser Lys Arg Tyr Phe	
1 5	
GTC ACC GGA ACG GAT ACC GAA GTG GGG AAA ACT GTC GCC AGT TGT GCA	3108
Val Thr Gly Thr Asp Thr Glu Val Gly Lys Thr Val Ala Ser Cys Ala	
10 15 20	
CTT TTA CAA GCC GCA AAG GCA GCA GGC TAC CGG ACG GCA GGT TAT AAA	3156
Leu Leu Gln Ala Ala Lys Ala Ala Gly Tyr Arg Thr Ala Gly Tyr Lys	
25 30 35	
CCG GTC GCC TCT GGC AGC GAA AAG ACC CCG GAA GGT TTA CGC AAT AGC	3204
Pro Val Ala Ser Gly Ser Glu Lys Thr Pro Glu Gly Leu Arg Asn Ser	
40 45 50	
GAC GCG CTG GCG TTA CAG CGC AAC AGC AGC CTG CAG CTG GAT TAC GCA	3252
Asp Ala Leu Ala Leu Gln Arg Asn Ser Ser Leu Gln Leu Asp Tyr Ala	
55 60 65 70	
ACA GTA AAT CCT TAC ACC TTC GCA GAA CCC ACT TCG CCG CAC ATC ATC	3300
Thr Val Asn Pro Tyr Thr Phe Ala Glu Pro Thr Ser Pro His Ile Ile	
75 80 85	
AGC GCG CAA GAG GGC AGA CCG ATA GAA TCA TTG GTA ATG AGC GCC GGA	3348
Ser Ala Gln Glu Gly Arg Pro Ile Glu Ser Leu Val Met Ser Ala Gly	
90 95 100	
TTA CGC GCG CTT GAA CAA CAG GCT GAC TGG GTG TTA GTG GAA GGT GCT	3396
Leu Arg Ala Leu Glu Gln Gln Ala Asp Trp Val Leu Val Glu Gly Ala	
105 110 115	
GGC GGC TGG TTT ACG CCG CTT TCT GAC ACT TTC ACT TTT GCA GAT TGG	3444
Gly Gly Trp Phe Thr Pro Leu Ser Asp Thr Phe Thr Phe Ala Asp Trp	
120 125 130	
GTA ACA CAG GAA CAA CTG CCG GTG ATA CTG GTA GTT GGT GTG AAA CTC	3492
Val Thr Gln Glu Gln Leu Pro Val Ile Leu Val Val Gly Val Lys Leu	
135 140 145 150	
GGC TGT ATT AAT CAC GCG ATG TTG ACT GCA CAG GTA ATA CAA CAC GCC	3540
Gly Cys Ile Asn His Ala Met Leu Thr Ala Gln Val Ile Gln His Ala	
155 160 165	
GGA CTG ACT CTG GCG GGT TGG GTG GCG AAC GAT GTT ACG CCT CCG GGA	3588
Gly Leu Thr Leu Ala Gly Trp Val Ala Asn Asp Val Thr Pro Pro Gly	
170 175 180	
AAA CGT CAC GCT GAA TAT ATG ACC ACG CTC ACC CCG ATG ATT CCC GCG	3636
Lys Arg His Ala Glu Tyr Met Thr Thr Leu Thr Arg Met Ile Pro Ala	
185 190 195	

64

CCG CTG CTG GGA GAG ATC CCC TGG CTT GCA GAA AAT CCA GAA AAT GCG	3684
Pro Leu Leu Gly Glu Ile Pro Trp Leu Ala Glu Asn Pro Glu Asn Ala	
200 205 210	
GCA ACC GGA AAG TAC ATA AAC CTT GCC TTC GTC GAC GCG TCG ACT CTA	3732
Ala Thr Gly Lys Tyr Ile Asn Leu Ala Phe Val Asp Ala Ser Thr Leu	
215 220 225 230	
GGG TTT ACA AGT CGA TTA TGACAACGGA CGATCTTGCC TTGACCAAC	3780
Gly Phe Thr Ser Arg Leu	
235	
GCCATATCTG GCACCCATAC ACATCCATGA CCTCCCCCTC GCCGGTTTAT CCGGTGGTGA	3840
GGCCGGAAGG TTGCGAGCTG ATTTTGTCTG ACGGCAGACG CCTGGTTGAC GGTATGTCGT	3900
CCTGGTGGGC GGCGATCCAC GGCTACAATC ACCCGCAGCT TAATGCGGCG ATGAAGTCGC	3960
AAATTGATGC CATGTGCAT GTGATGTTG GCGGTATCAC CCATGCGCCA GCCATTGAGC	4020
TGTGCGCAA ACTGGTGGCG ATGACGCGCG AACCGTGGG GTGCGTTTTT CTCGCGGACT	4080
CCGGTTCCGT AGCGGTGGAA GTGGCGATGA AAATGGCGTT GCAGTACTGG CAAGCCAAAG	4140
GCGAAGCGCG CCAGCGTTTT CTGACCTTCC GCAATGGTTA TCATGGCGAT ACCTTTGGCG	4200
CGATGTCGGT GTGCGATCGG GATAACTCAA TGCACAGTCT GTGGAAAGGC TACCTGCCAG	4260
AAAACCTGTT TGCTCCCGCC CGGCAAAGCC GCATGGATGG CGAATGGGAT GAGCGCGATA	4320
TGGTGGGCTT TGCCCGCCTG ATGGCGGCGC ATCGTCATGA AATCGCGCGG GTGATCATIG	4380
AGCCGATTGT CCAGGGCGCA GGGGGATGC GCATGTACCA TCCGGAATGS TTAACAAGAA	4440
TCCGCAAAAT ATGCGATCGC GAAGGTATCT TGCTGATTGC CGACGAGATC GCCACTGGAT	4500
TTGGTCGTAC CGGGAAACTG TTTGCCTGTG AACATGCAGA AATCGCGCGG GACATTTTGT	4560
GCCTCGGTAA AGCCTTAACC GGGGCAACA TGACCCCTTC CGCCACACTC ACCACGCGCG	4620
AGGTTCGAGA AACCATCAGT AACGGTGAAG CCGGTTGCTT TATGCATGGG CCAACTTTTA	4680
TGGGCAATCC GCTGGCCTGC GGGGAGCAA ACGCCAGCCT GCGATTCTC GAATCTGGCG	4740
ACTGGCAGCA ACAGGTGGCG GATATTGAAG TACAGCTCGG CGAGCAACTT GCGCCCGGCC	4800
GTGATGCCGA AATGGTTGCC GATGTGCGCG TACTGGGGGC CATTGGCGTG GTCGAAACCA	4860
CTCATCCGGT GAATATGGCG GCGTGCAAA AATCTTTGT CGAACAGGT GTCTGGATCC	4920
GGCCTTTTGG CAAACTGATT TACCTGATGC CGCCCTATAT TATTCTCCCG CAACAGTTGC	4980
AGCGTCTGAC CGCAGCGGTT AACCGCGCGG TACAGGATGA AACATTTTTT TGCCAATAAC	5040
GAGAAGTCCG CGTGAGGGTT TCTGGCTACA CTTTCTGCAA ACAAGAAAGG AGGGTTCATG	5100
AAACTCATCA GTAACGATCT GCGCGATGGC GATAAATTGC CGCATCGTCA TGCTTTTAA	5160
GGCATGGGTT ACGATGGCGA TAATATTICA CCGCATCTGG CGTGGGATGA TGTTCTGCG	5220
GGAACGAAAA GTTTTGTGT CACCTGCTAC GACCCGATG CGCCAACCGG CTCGGGCTGG	5280
TGGCCTGGG TAGTTGTAA CTACCCGCT GATACCGCG TATTACCGCA AGGGTTTGGC	5340

65

TCTGGTCTGG TAGCAATGCC AGACGGCGTT TTGCAGACGC GTACCGACTT TGGTAAACC 5400
 GGGTACGATG GCGCAGCACC GCGGAAAGGC GAAACTCATC GCTACATTTT TACCGTTTAC 5460
 GCGCTGGATA TAGAACGTAT TGATGTCGAT GAAGGTGCCA GCGGCGCGAT GGTGCGGTTT 5520
 AACGTTTATT TCCACTCTCT GGCAAGCGCC TCGATTACTG CGATGTTTAG TTAATCACTC 5580
 TGCCAGATGG CGCAATGCCA TCTGGTATCA CTTAAAGGTA TTAATAACAA CTTTTTGTCT 5640
 TTTTACCTTC CCGTTTCGCT CAAGTTAGTA TAAAAAAGCA GGCTTCAACG GATTCAATTT 5700
 TCTATTTTAT AGCCCGGAGC AACCTGTGAA CACATTTTCA GTTTCGGTTC TGGCGCTGGC 5760
 ATTGGCTTTT GCGGTGACGC TGACCGCTG TAGCTCAACC CCGCCCGATC AACGTCCTTC 5820
 TGATCAAACC GCGCCTGGTA CCGAGCTCGA ATTCCTGCAG GCATGCAAGC TT 5872

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 384 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Ser Trp Gln Glu Lys Ile Asn Ala Ala Leu Asp Ala Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Leu Arg Arg Arg Tyr Pro Val Ala Gln Gly Ala Gly Arg
 20 25 30
 Trp Leu Val Ala Asp Asp Arg Gln Tyr Leu Asn Phe Ser Ser Asn Asp
 35 40 45
 Tyr Leu Gly Leu Ser His His Pro Gln Ile Ile Arg Ala Trp Gln Gln
 50 55 60
 Gly Ala Glu Gln Phe Gly Ile Gly Ser Gly Gly Ser Gly His Val Ser
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ser Val Val His Gln Ala Leu Glu Glu Glu Leu Ala Glu Trp
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Ser Arg Ala Leu Leu Phe Ile Ser Gly Phe Ala Ala Asn
 100 105 110
 Gln Ala Val Ile Ala Ala Met Met Ala Lys Glu Asp Arg Ile Ala Ala
 115 120 125
 Asp Arg Leu Ser His Ala Ser Leu Leu Glu Ala Ala Ser Leu Ser Pro
 130 135 140
 Ser Gln Leu Arg Arg Phe Ala His Asn Asp Val Thr His Leu Ala Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Ala Ser Pro Cys Pro Gly Gln Gln Met Val Val Thr Glu Gly
 165 170 175
 Val Phe Ser Met Asp Gly Asp Ser Ala Pro Leu Ala Glu Ile Gln Gln

66

180	185	190
Val Thr Gln Gln His Asn Gly Trp Leu Met Val Asp Asp Ala His Gly		
195	200	205
Thr Gly Val Ile Gly Glu Gln Gly Arg Gly Ser Cys Trp Leu Gln Lys		
210	215	220
Val Lys Pro Glu Leu Leu Val Val Thr Phe Gly Lys Gly Phe Gly Val		
225	230	235
Ser Gly Ala Ala Val Leu Cys Ser Ser Thr Val Ala Asp Tyr Leu Leu		
245	250	255
Gln Phe Ala Arg His Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Met Pro Pro Ala Gln		
260	265	270
Ala Gln Ala Leu Arg Ala Ser Leu Ala Val Ile Arg Ser Asp Glu Gly		
275	280	285
Asp Ala Arg Arg Glu Lys Leu Ala Ala Leu Ile Thr Arg Phe Arg Ala		
290	295	300
Gly Val Gln Asp Leu Pro Phe Thr Leu Ala Asp Ser Cys Ser Ala Ile		
305	310	315
Gln Pro Leu Ile Val Gly Asp Asn Ser Arg Ala Leu Gln Leu Ala Glu		
325	330	335
Lys Leu Arg Gln Gln Gly Cys Trp Val Thr Ala Ile Arg Pro Pro Thr		
340	345	350
Val Pro Ala Gly Thr Ala Arg Leu Arg Leu Thr Leu Thr Ala Ala His		
355	360	365
Glu Met Gln Asp Ile Asp Arg Leu Leu Glu Val Leu His Gly Asn Gly		
370	375	380

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 236 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val Ser Lys Arg Tyr Phe Val Thr Gly Thr Asp Thr Glu Val Gly Lys		
1	5	10
Thr Val Ala Ser Cys Ala Leu Leu Gln Ala Ala Lys Ala Ala Gly Tyr		
20	25	30
Arg Thr Ala Gly Tyr Lys Pro Val Ala Ser Gly Ser Glu Lys Thr Pro		
35	40	45
Glu Gly Leu Arg Asn Ser Asp Ala Leu Ala Leu Gln Arg Asn Ser Ser		

67

50	55	60
Leu Gln Leu Asp Tyr Ala Thr Val Asn Pro Tyr Thr Phe Ala Glu Pro		
65	70	75
Thr Ser Pro His Ile Ile Ser Ala Gln Glu Gly Arg Pro Ile Glu Ser		
85	90	95
Leu Val Met Ser Ala Gly Leu Arg Ala Leu Glu Gln Gln Ala Asp Trp		
100	105	110
Val Leu Val Glu Gly Ala Gly Gly Trp Phe Thr Pro Leu Ser Asp Thr		
115	120	125
Phe Thr Phe Ala Asp Trp Val Thr Gln Glu Gln Leu Pro Val Ile Leu		
130	135	140
Val Val Gly Val Lys Leu Gly Cys Ile Asn His Ala Met Leu Thr Ala		
145	150	155
Gln Val Ile Gln His Ala Gly Leu Thr Leu Ala Gly Trp Val Ala Asn		
165	170	175
Asp Val Thr Pro Pro Gly Lys Arg His Ala Glu Tyr Met Thr Thr Leu		
180	185	190
Thr Arg Met Ile Pro Ala Pro Leu Leu Gly Glu Ile Pro Trp Leu Ala		
195	200	205
Glu Asn Pro Glu Asn Ala Ala Thr Gly Lys Tyr Ile Asn Leu Ala Phe		
210	215	220
Val Asp Ala Ser Thr Leu Gly Phe Thr Ser Arg Leu		
225	230	235

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 143 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(111) HYPOTHETISCH: NEIN

(111) ANTISENSE: NEIN

(11) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(111) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pBO30

(111) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..24
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
/EC_number= 6.3.3.3
/product= "Dethiobiotin Synthase"
/gene= "bioD"

68

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 120..143
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
 /codon_start= 120
 /EC_number= 2.6.1.62
 /product= "DAPA Synthase"
 /gene= "bioA"
 /pseudo

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
 (B) LAGE: 111..122
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioA RBS"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: stem_loop
 (B) LAGE: 38..85

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTEILUNG:

(H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1
 (I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986
 (J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TAC ATA AAC CTT GCC TTG TTG TAGCCATTCT GTATTGGTT AAATTGCGAG	51
Tyr Ile Asn Leu Ala Leu Leu	
1 5	
CGAGATCGCG TCTTCGATTG ACTGCAATTT AACCTCTAG AGTCGACTCT AGGGTTTACA	111
AGTCGATT ATG ACA ACG GAC GAT CTT GCC TTT	143
Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe	
1 5	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Tyr Ile Asn Leu Ala Leu Leu	
1 5	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

69

Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Escherichia coli*

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pB030A-9

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..24
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
/codon_start= 1
/EC_number= 6.3.3.3
/product= "DTB Synthase"
/gene= "bioD"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 70..93
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
/codon_start= 70
/EC_number= 2.6.1.62
/product= "DAPA Synthase"
/gene= "bioA"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
- (B) LAGE: 61..72
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioA RBS"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELM:

- (H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1
- (I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986
- (J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TAC ATA AAC CTT GCC TTG TTG TAGCCATTCT GTATTGGTT CGTCGACTCT
Tyr Ile Asn Leu Ala Leu Leu
1 5

51

AGGGTTTACA AGTCGATT ATG ACA ACG GAC GAT CTT GCC TTT
Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe
1 5

93

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

70

(1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKULS: Protein

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Tyr Ile Asn Leu Ala Leu Leu
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKULS: Protein

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Thr Thr Asp Asp Leu Ala Phe
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 77 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(11) ART DES MOLEKULS: DNS (genomisch)

(111) HYPOTHETISCH: NEIN

(111) ANTISENSE: NEIN

(v1) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(v11) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pBO30A-15

(1x) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLUSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..57
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
/codon_start= 1
/function= "altered 3'-end"
/EC_number= 6.3.3.3
/product= "DTB Synthase"
/gene= "bioD"

(1x) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLUSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 54..77
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /partial
/codon_start= 54
/EC_number= 2.6.1.62

71

/product= "DAPA Synthase"
/gene= "bioA"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
- (B) LÄNGE: 45..56
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "bioA RBS"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTEILUNG:

- (H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1
- (I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986
- (J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TAC ATA AAC CTT GCC TTC GTC GAC GCG TCG ACT CTA GGG TTT ACA AGT	48
Tyr Ile Asn Leu Ala Phe Val Asp Ala Ser Thr Leu Gly Phe Thr Ser	
1 5 10 15	
CGA TTA TGACAAACGGA CGATCTTGCC TTT	77
Arg Leu	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Tyr Ile Asn Leu Ala Phe Val Asp Ala Ser Thr Leu Gly Phe Thr Ser
1 5 10 15
Arg Leu

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 125 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pBD30A-15/985E

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -10_signal

72

(B) LAGE: 45..49

(D) SONSTIGE ANGABEN: /standard_name= "promoter ptac"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: promoter

(B) LAGE: 1..96

(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell

(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "promoter ptac"
/evidence= EXPERIMENTAL

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

(H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1

(I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986

(J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT	60
GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTTAGGAGG TGACTAGTCA	120
TGGCT	125

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 126 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pB030A-15/16

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: promoter

(B) LAGE: 1..96

(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell

(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "promoter ptac"
/evidence= EXPERIMENTAL

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS

(B) LAGE: 105..123

(C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell

(D) SONSTIGE ANGABEN: /evidence= EXPERIMENTAL
/standard_name= "bioB RBS no.16"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

(H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1

(I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986

(J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

73

AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT 60
 GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGG TTTACTAGTC 120
 ATGGCT 126

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 122 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pB030A-15/9

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: promoter
- (B) LAGE: 1..96
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "promoter ptac"
/evidence= EXPERIMENTAL

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: RBS
- (B) LAGE: 105..119
- (C) ART DER ERMITTLUNG: experimentell
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /evidence= EXPERIMENTAL
/standard_name= "bioB RBS no. 9"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

- (H) DOCUMENTNUMMER: WO 87/01391 B1
- (I) ANMELDEDATUM: 26-AUG-1986
- (J) VERÖFFENTLICHUNGSTAG: 07-APR-1993

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT 60
 GTGAGCGGAT AACAAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTCA1GG 120
 CT 122

Ansprüche

- 5 1. DNA-Fragment umfassend die Gene der Biotin-Biosynthese bioB, bioF, bioC, bioD und bioA oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien, worin die Gene in einer Transkriptionseinheit angeordnet sind.
- 10 2. DNA-Fragment nach Anspruch 1, worin die Enterobakterien ausgewählt sind aus der Gruppe der Gattungen Escherichia, Salmonella und Citrobacter.
- 15 3. DNA-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, worin die Enterobakterien ausgewählt sind aus der Spezies Escherichia coli.
4. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das genregulatorische Element der Transkriptionseinheit den tac-Promotor umfaßt.
- 20 5. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
25 GTGAGCGGAT AACAAATTTC CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTTAGGAGG TGACTAGTC
6. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
30 AAGCTTACTC CCCATCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
GTGAGCGGAT AACAAATTTC CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGG TTTACTAGTC

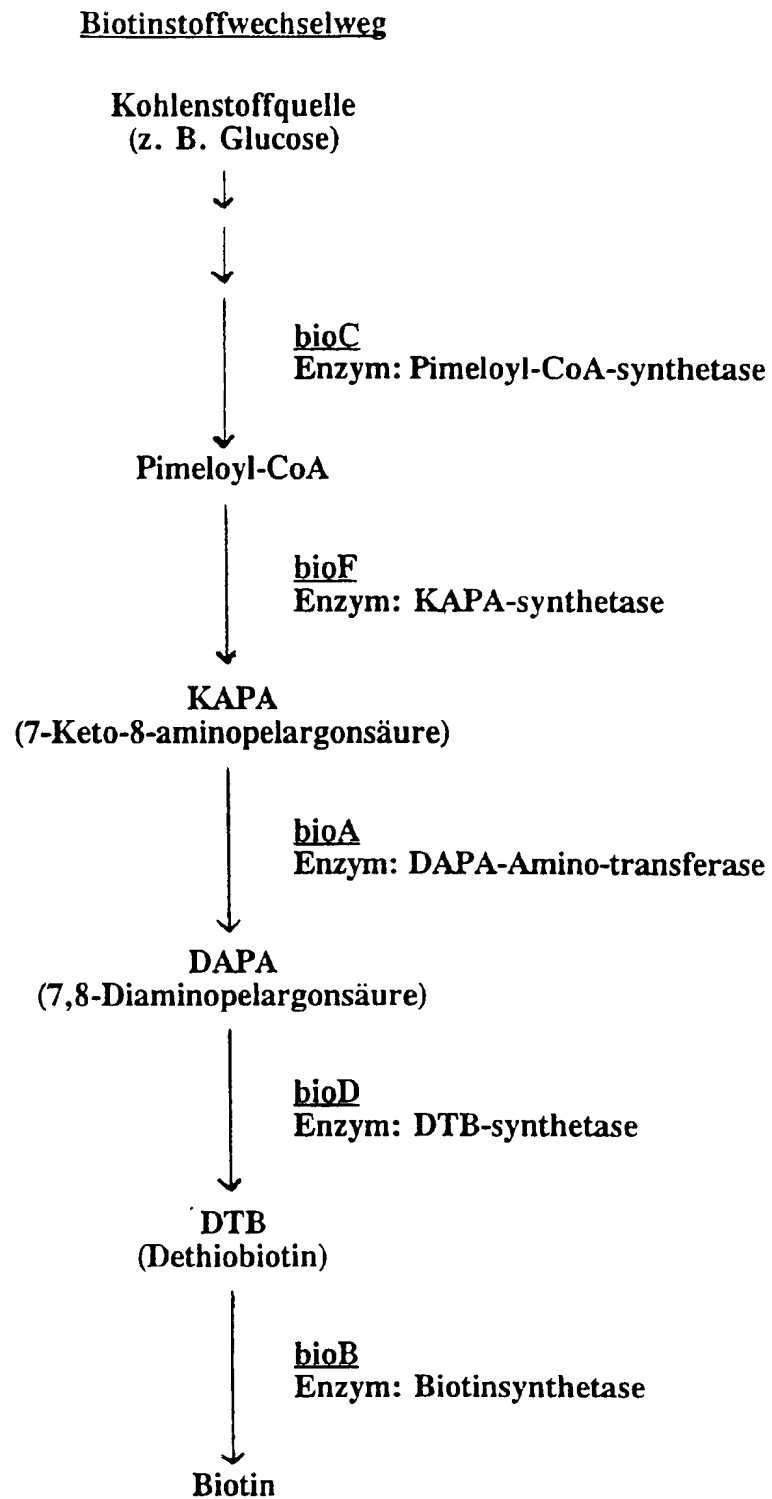
7. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das genregulatorische Element, in direkter Verknüpfung mit dem bioB-Gen, die Sequenz umfaßt:
AAGCTTACTC CCCATCCCCC TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
5 GTGAGCGGAT AACCAATTCA CACAGGAAAC AGGATCGGTA CCTAAGGAGA CTAGTC
8. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin der Abstand zwischen den in der Transkriptionseinheit aufeinanderfolgenden Genen bioD und bioA nicht mehr als 50bp beträgt.
10
9. DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin die Gene bioD und bioA derart angeordnet sind, daß der 3'-Terminus des bioD-Gens die Ribosomenbindungsstelle für das bioA-Gen umfaßt.
15
10. Plasmid, enthaltend ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
- 20 11. Plasmid pBO30A-15/9, wie hinterlegt in E. coli XL1-Blue, E. coli BM4062 oder E. coli ED8767 unter den Hinterlegungsnummern DSM 7246, DSM 7247 bzw. DSM 8554.
- 25 12. Plasmid pBO47, wie hinterlegt in Agrobacterium/Rhizobium sp. HK4 unter der Hinterlegungsnummer DSM 8555.
13. Mikroorganismus, enthaltend ein DNA-Fragment oder ein Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
- 30 14. E. coli XL1-Blue, E. coli BM4062 und E. coli ED8767, jeweils enthaltend Plasmid pBO30A-13/9, hinterlegt unter den Hinterlegungsnummern DSM 7246, DSM 7247 bzw. DSM 8554, sowie deren genetische Varianten und Mutanten.

15. Agrobacterium/Rhizobium sp HK4, enthaltend Plasmid pBO47, hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 8555, sowie dessen genetische Varianten und Mutanten.
- 5 16. Biotechnologisches Verfahren zur Biotinsynthese, worin eine verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle mittels eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zu Biotin fermentiert wird.
- 10 17. Verfahren zur Herstellung von Biotin, das die Umsetzung von Dethiobiotin zu Biotin im zellfreien System mittels Biotinsynthase umfaßt, worin die Umsetzung in Gegenwart von Thiaminpyrophosphat, NADPH, S-Adenosylmethionin, Fe^{2+} -Ionen, Cystein und wenigstens einer weiteren Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin erfolgt.
- 15 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin die Umsetzung in Gegenwart von Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase durchgeführt wird.
- 20 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 oder 18, worin die Umsetzung in Gegenwart einer Proteinfraction durchgeführt wird, die erhältlich ist durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, bei 45%-iger Sättigung, eines Zellextrakts von Escherichia coli.
- 25 20. Proteinfraction mit Biotinsynthase-stimulierender Wirkung, erhältlich durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, bei 45%-iger Sättigung, eines Zellextrakts von Escherichia coli.
- 30 21. Verwendung einer Proteinfraction gemäß Anspruch 20 in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 35

22. Verwendung von Flavodoxin und Ferredoxin(Flavodoxin)-NADP⁺-Reduktase in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 5 23. Verwendung von Thiaminpyrophosphat und/oder NADPH und/oder S-Adenosylmethionin und/oder Fe²⁺-Ionen und/oder Cystein und/oder wenigstens einer weiteren Aminosäure aus der Gruppe Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin, einzeln oder in Kombination, in einem Verfahren zur Herstellung von Biotin im zellfreien System.
- 10

I/15

Fig. 1

**ERSATZBLATT**

2/15

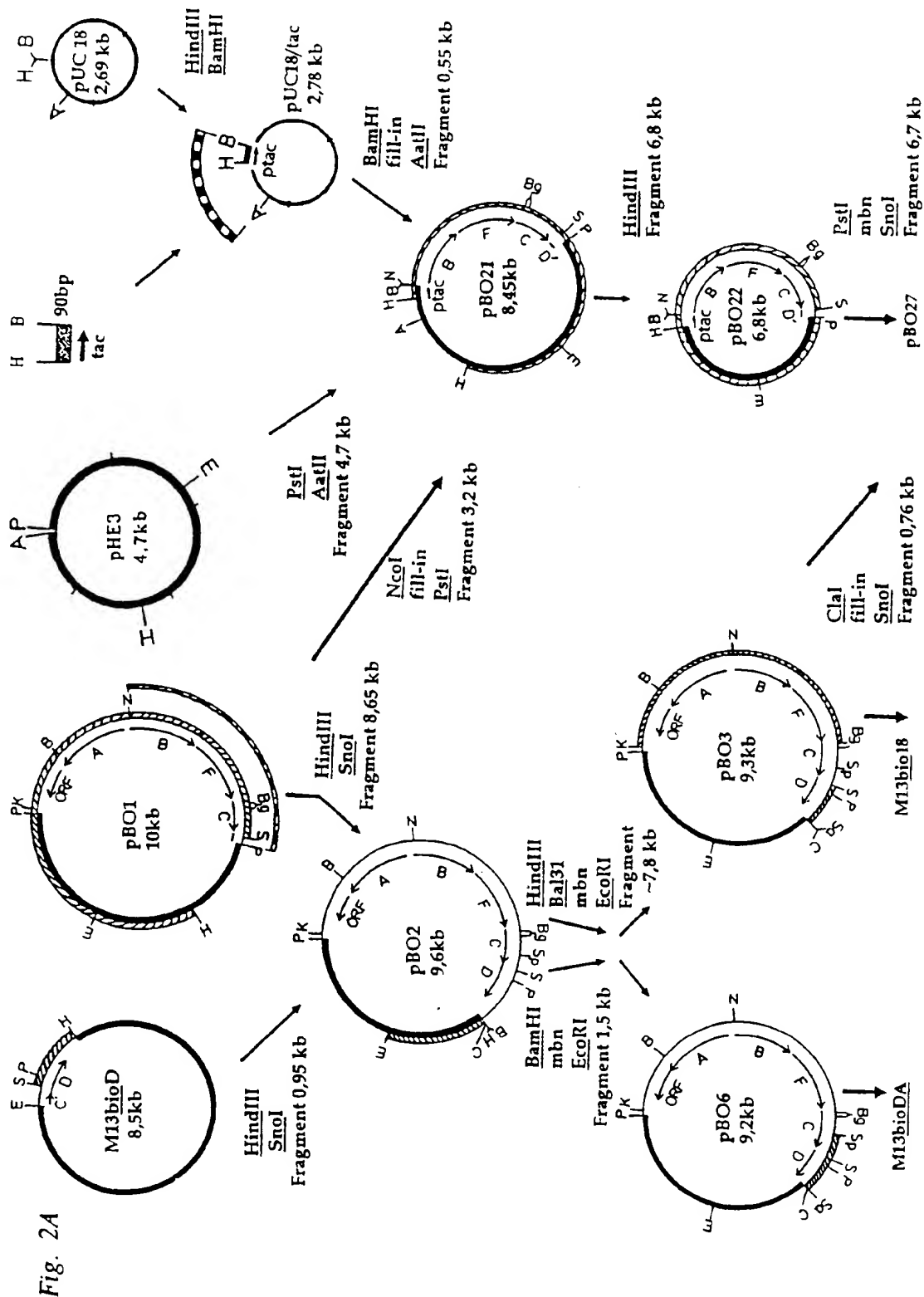


Fig. 2A

ERSATZBLATT

3/15

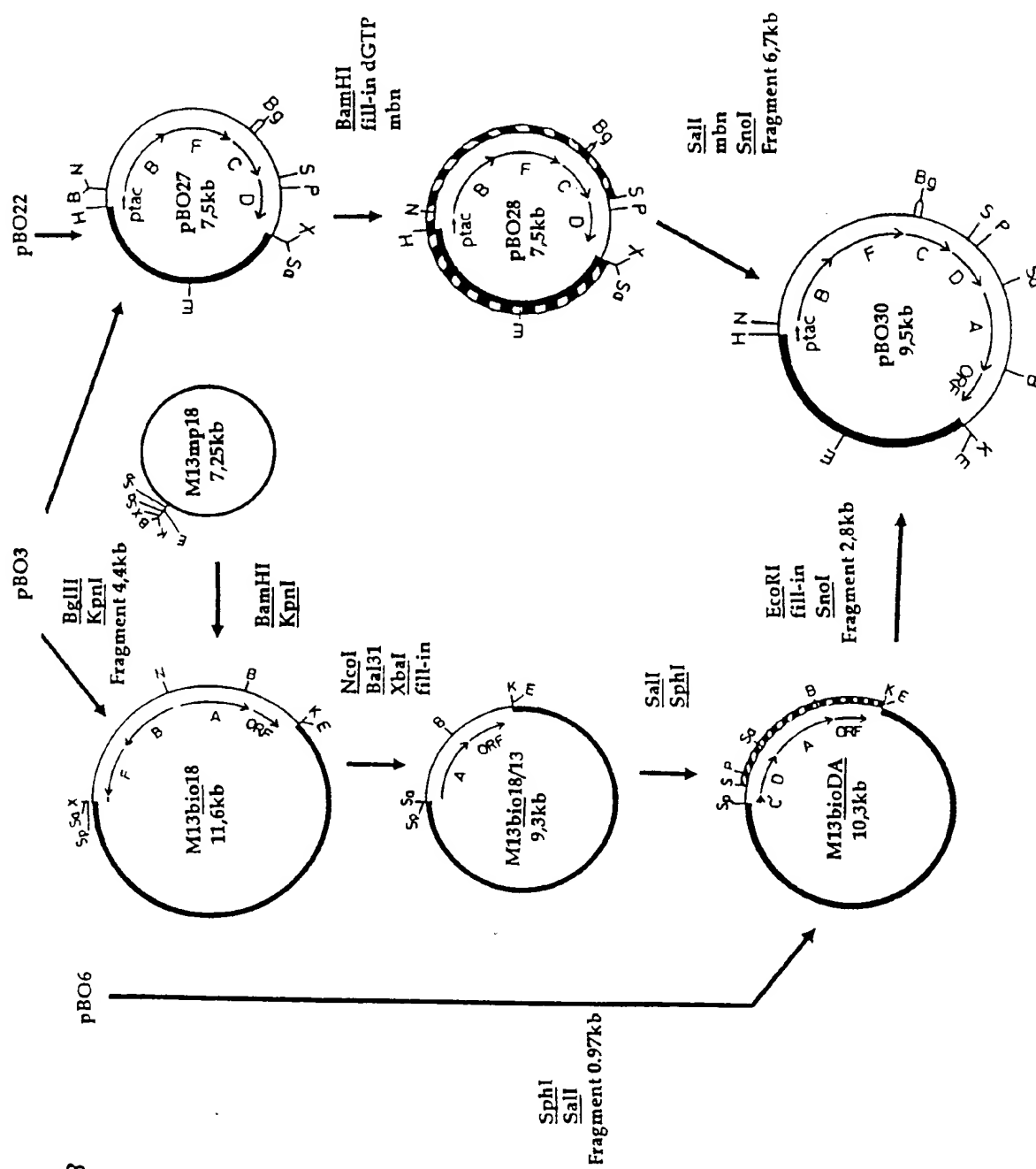
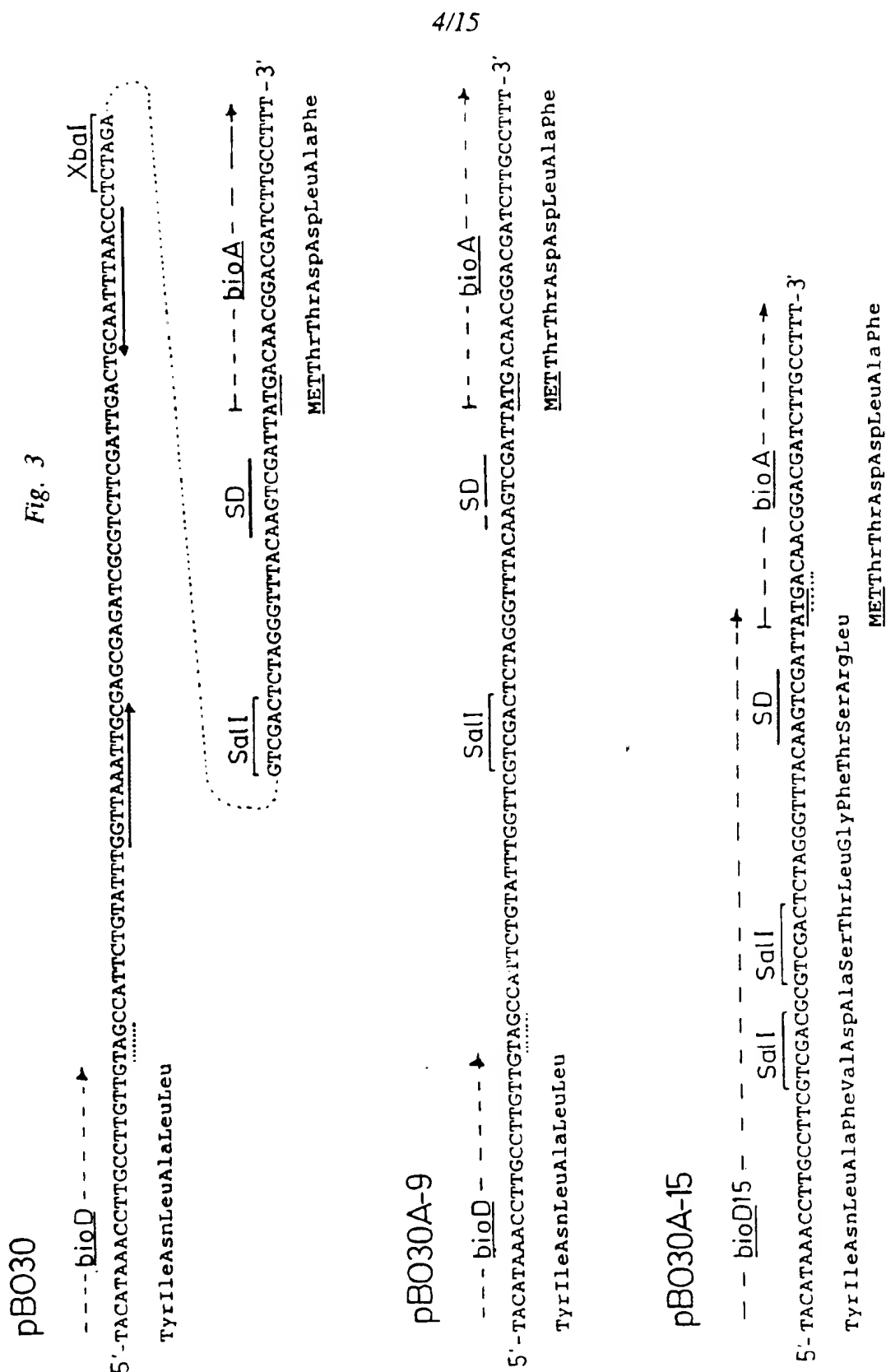


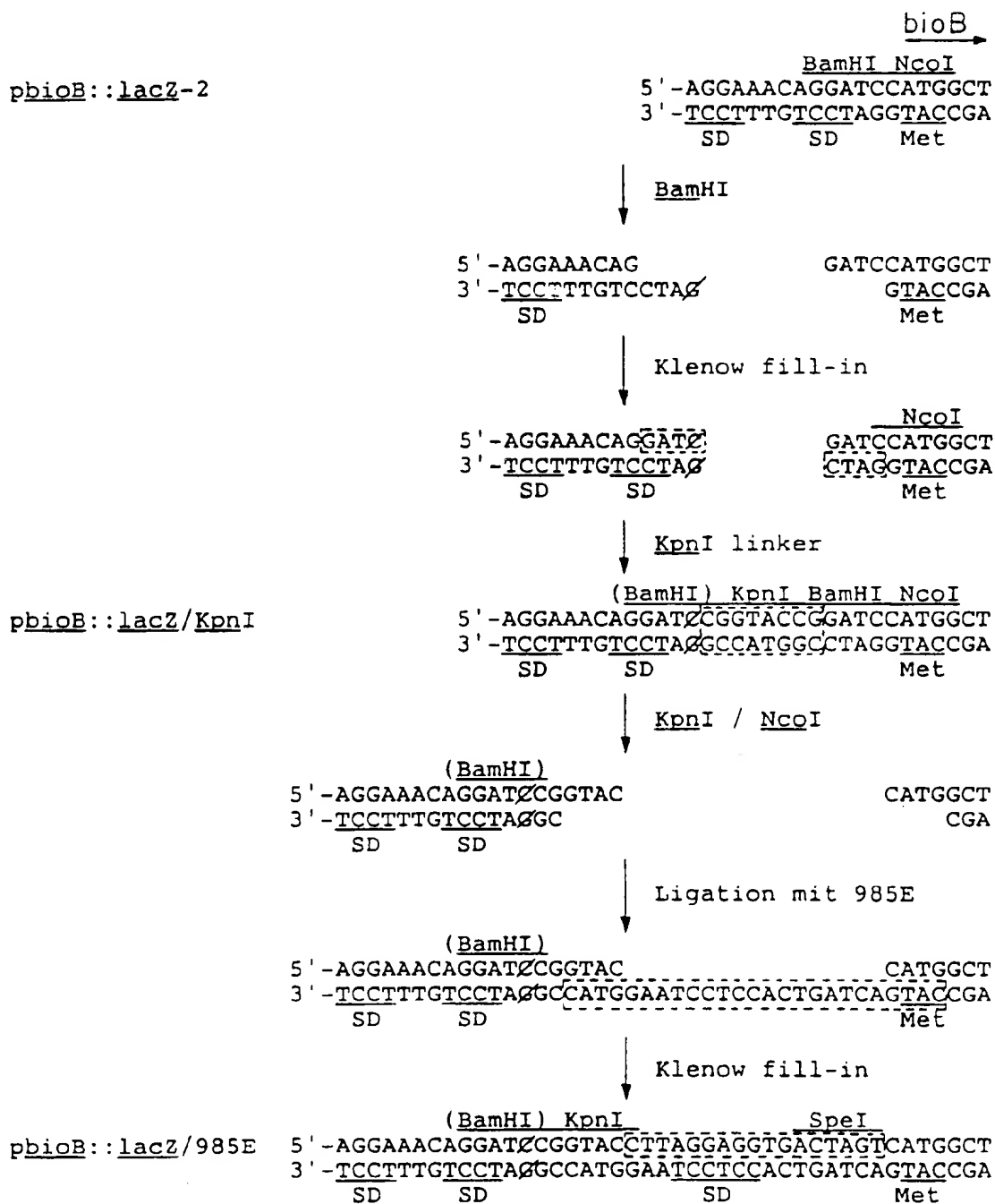
Fig. 2B

ERSATZBLATT



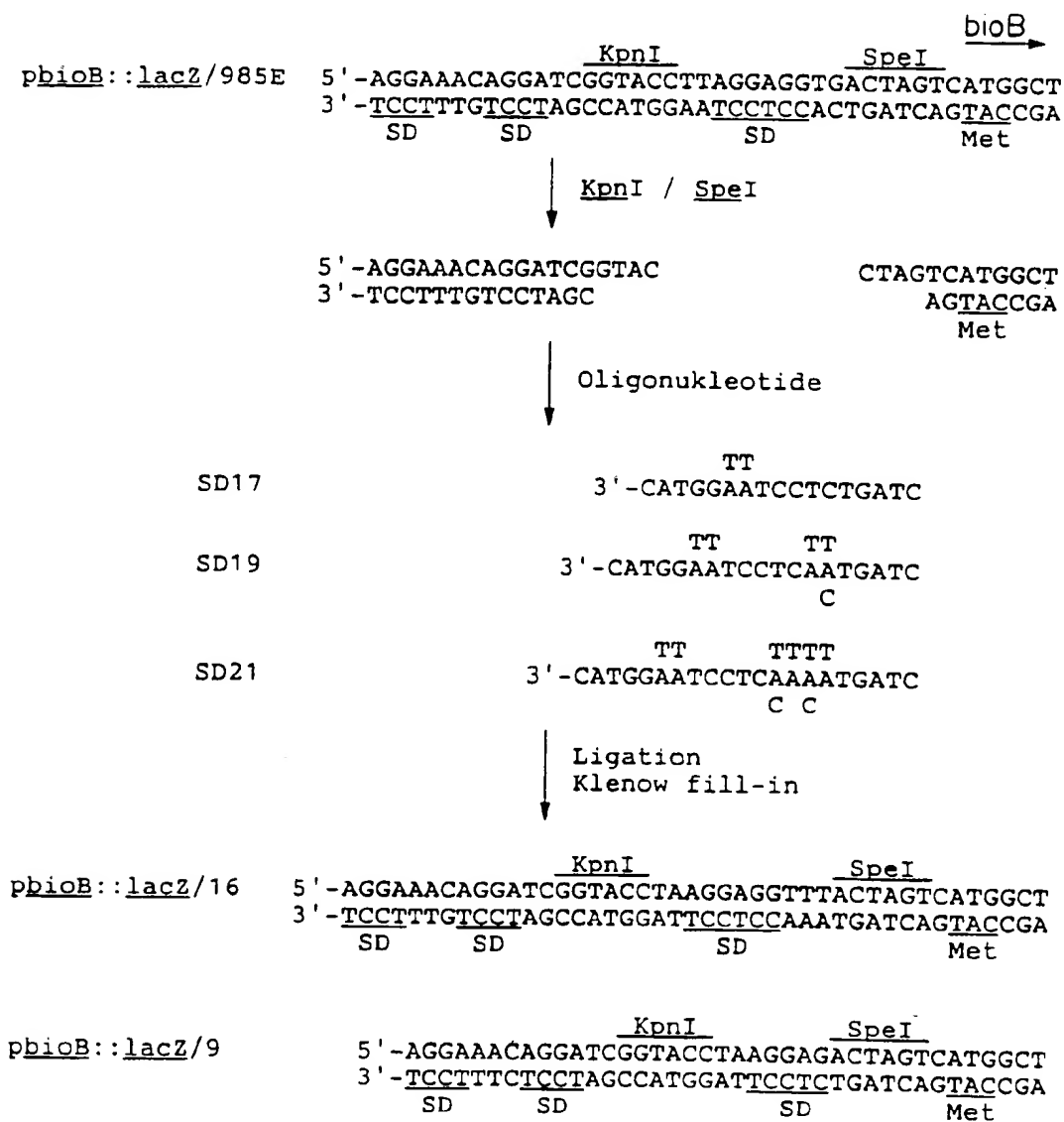
5/15

Fig. 4A



6/15

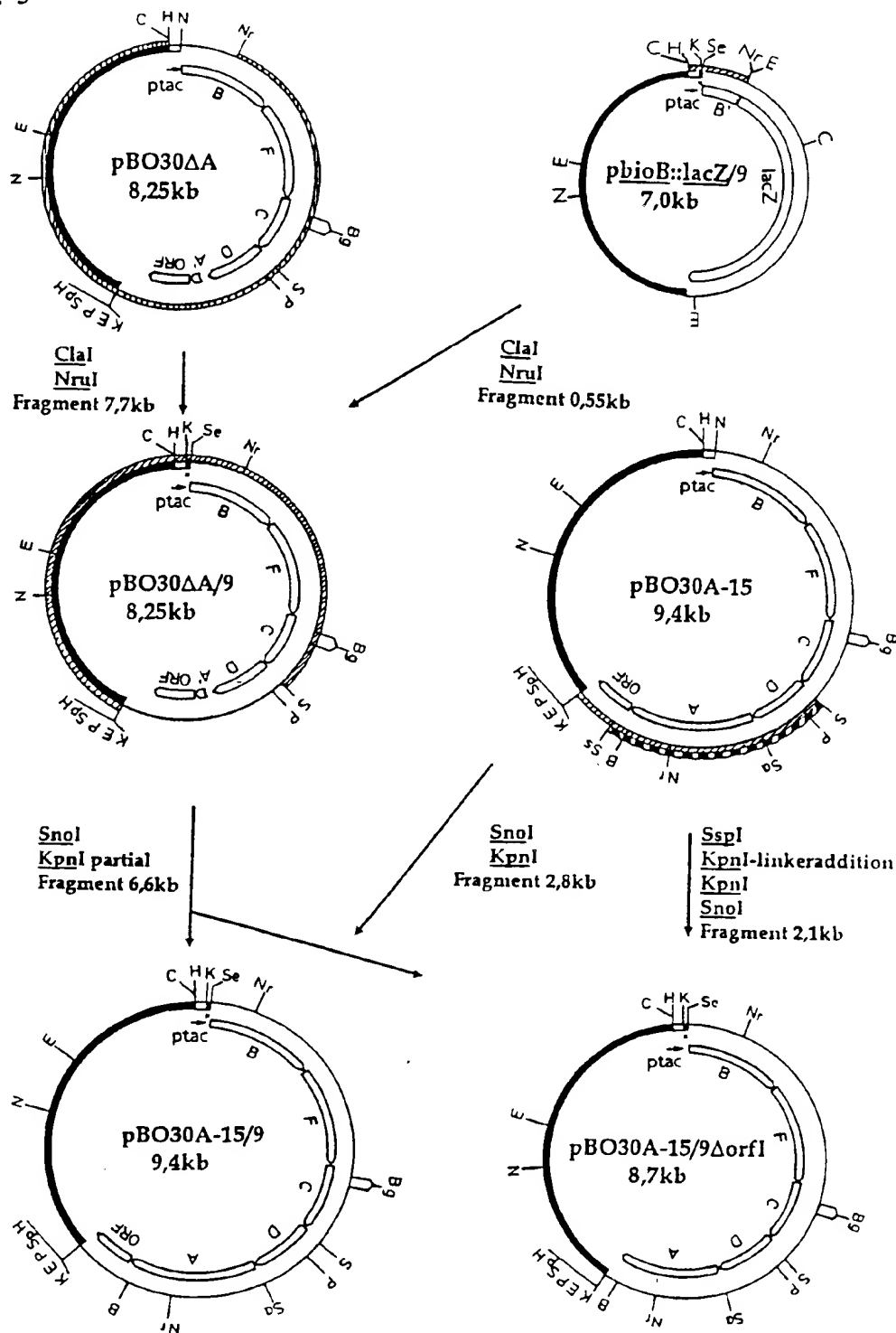
Fig. 4B



ERSATZBLATT

7/15

Fig. 5



ERSATZBLATT

8/15

Fig. 6A

HindIII

1 5'-AAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATT
-35 ptac -10 +1

KpnI SauI SpeI bioB

61 GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCGGTACCTAAGGAGACTAGTCATGG
SD METAla

121 CTCACCGCCCACGCTGGACATTGTGCAAGTCACAGAATTATTTGAAAAACCGTTGCTGG
HisArgProArgTrpThrLeuSerGlnValThrGluLeuPheGluLysProLeuLeuAsp

181 ATCTGCTGTTTGAAGCGCAGCAGGTGCATCGCCAGCATTTTCGATCCTCGTCAGGTGCAGG
LeuLeuPheGluAlaGlnGlnValHisArgGlnHisPheAspProArgGlnValGlnVal

241 TCAGCACGTTGCTGTCTGATTAAGACCGGAGCTTGTCGGGAAGATTGCAAATACTGCCCGC
SerThrLeuLeuSerIleLysThrGlyAlaCysProGluAspCysLysTyrCysProGln

301 AAAGCTCGCGCTACAAAACCGGGCTGGAAGCCGAGCGGTTGATGGAAGTTGAACAGGTGC
SerSerArgTyrLysThrGlyLeuGluAlaGluArgLeuMETGluValGluGlnValLeu

BssHII

361 TGGAGTCGGCGCGCAAAGCGAAAGCGGCAGGATCGACGCGCTTCTGTATGGGCGCGGCGT
GluSerAlaArgLysAlaLysAlaAlaGlySerThrArgPheCysMETGlyAlaAlaTrp

421 GGAAGAATCCCCACGAACGCGATATGCCGTACCTGGAACAAATGGTGCAGGGGGTAAAAG
LysAsnProHisGluArgAspMETProTyrLeuGluGlnMETValGlnGlyValLysAla

481 CGATGGGGCTGGAGGCGTGTATGACGCTGGGCACGTTGAGTGAATCTCAGGCCGACGCC
METGlyLeuGluAlaCysMETThrLeuGlyThrLeuSerGluSerGlnAlaGlnArgLeu

NruI

541 TCGCGAACGCCGGGCTGGATTACTACAACCACAACCTGGACACCTCGCCGGAGTTTTACG
AlaAsnAlaGlyLeuAspTyrTyrAsnHisAsnLeuAspThrSerProGluPheTyrGly

601 GCAATATCATCACCACACGCACTTATCAGGAACGCCTCGATACGCTGGAAAAAGTGC GCG
AsnIleIleThrThrArgThrTyrGlnGluArgLeuAspThrLeuGluLysValArgAsp

661 ATGCCGGGATCAAAGTCTGTTCTGGCGGCATTGTGGGCTTAGGCGAAACGGTAAAAGATC
AlaGlyIleLysValCysSerGlyGlyIleValGlyLeuGlyGluThrValLysAspArg

721 GCGCCGATTATTGCTGCAACTGGCAAACCTGCCGACGCCGCGGAAAGCGTGCCAATCA
AlaGlyLeuLeuLeuGlnLeuAlaAsnLeuProThrProProGluSerValProIleAsn

781 ACATGCTGGTGAAGGTGAAAGGCACGCCGCTTGCCGATAACGATGATGTGCGATGCCTTTG
METLeuValLysValLysGlyThrProLeuAlaAspAsnAspAspValAspAlaPheAsp

Fig. 6B

ERSATZBLATT

10/15

Fig. 6C

1681 CGTGTTCAGCATGGACGGCGATAGTGCGCCACTGGCGGAAATCCAGCAGGTAACGCAACA
 ValPheSerMETAspGlyAspSerAlaProLeuAlaGluIleGlnGlnValThrGlnGln

 1741 GCACAATGGCTGGTTGATGGTCGATGATGCCACGGCACGGGCGTTATCGGGGAGCAGGG
 HisAsnGlyTrpLeuMETValAspAspAlaHisGlyThrGlyValIleGlyGluGlnGly

 1801 PvuII
 GCGCGGCAGCTGCTGGCTGCAAAAGGTAAAACCAGAATTGCTGGTAGTGACTTTTGGCAA
 ArgGlySerCysTrpLeuGlnLysValLysProGluLeuLeuValValThrPheGlyLys

 1861 AGGATTTGGCGTCAGCGGGGACGCGGTGCTTTGCTCCAGTACGGTGGCGGATTATCTGCT
 GlyPheGlyValSerGlyAlaAlaValLeuCysSerSerThrValAlaAspTyrLeuLeu

 1921 GCAATTCGCCCCCACCTTATCTACAGCACCAGTATGCCGCCGCTCAGGCGCAGGCATT
 GlnPheAlaArgHisLeuIleTyrSerThrSerMETProProAlaGlnAlaGlnAlaLeu

 1981 ACGTGCGTCGCTGGCGGTCATTTCGCAGTGATGAGGGTGATGCACGGCGCGAAAACTGGC
 ArgAlaSerLeuAlaValIleArgSerAspGluGlyAspAlaArgArgGluLysLeuAla

 2041 MluI
 GGCACTCATTACGCGTTTTCGTGCCGGAGTACAGGATTTGCCGTTTACGCTTGCTGATTC
 AlaLeuIleThrArgPheArgAlaGlyValGlnAspLeuProPheThrLeuAlaAspSer

 2101 ATGCAGCGCCATCCAGCCATTGATTGTCCGGTGATAACAGCCGTGCGTTACAACCTGGCAGA
 CysSerAlaIleGlnProLeuIleValGlyAspAsnSerArgAlaLeuGlnLeuAlaGlu

 2161 AAAACTGCGTCAGCAAGGCTGCTGGGTACGGCGATTTCGCCGCCAACCGTACCCGCTGG
 LysLeuArgGlnGlnGlyCysTrpValThrAlaIleArgProProThrValProAlaGly

 2221 FspI EcoRV
 TACTGCGCGACTGCGCTTAACGCTAACCGCTGCGCATGAAATGCAGGATATCGACCGTCT
 ThrAlaArgLeuArgLeuThrLeuThrAlaAlaHisGluMETGlnAspIleAspArgLeu

 2281 bioC
 GCTGGAGGTGCTGCATGGCAACGGTTAATAACAAGCCATTGCAGCGGCATTGGTCCGGG
 SD METAlaThrValAsnLysGlnAlaIleAlaAlaAlaPheGlyArgAla
 LeuGluValLeuHisGlyAsnGly*****

 2341 BglII
 CAGCCGCACACTATGAGCAACATGCAGATCTACAGCGCCAGAGTGCTGACGCCTTACTGG
 AlaAlaHisTyrGluGlnHisAlaAspLeuGlnArgGlnSerAlaAspAlaLeuLeuAla

 2401 (AvaII)
 CAATGCTTCCACAGCGTAAATACACCCACGTACTGGACGCGGGTTGTGGACCTGGCTGGA
 METLeuProGlnArgLysTyrThrHisValLeuAspAlaGlyCysGlyProGlyTrpMET

 2461 BglII
 TGAGCCGCCACTGGCGGGAACGTCACGCGCAGGTGACGGCCTTAGATCTCTCGCCGCCAA
 SerArgHisTrpArgGluArgHisAlaGlnValThrAlaLeuAspLeuSerProPromET

ERSATZBLATT

11/15

Fig. 6D

2521 TGCTTGTTTCAGGCACGCCAGAAGGATGCCGCAGACCATTATCTGGCGGGAGATATCGAAT
 LeuValGlnAlaArgGlnLysAspAlaAlaAspHisTyrLeuAlaGlyAspIleGluSer EcoRV

2581 CCCTGCCGTTAGCGACTGCGACGTTTCGATCTTGCATGGAGCAATCTCGCAGTGCAGTGGT
 LeuProLeuAlaThrAlaThrPheAspLeuAlaTrpSerAsnLeuAlaValGlnTrpCys

2641 GCGGTAATTTATCCACGGCACTCCGCGAGCTGTATCGGGTGGTGCGCCCAAAGGCGTGG
 GlyAsnLeuSerThrAlaLeuArgGluLeuTyrArgValValArgProLysGlyValVal

2701 TCGCGTTTACCACGCTGGTGCAGGGATCGTTACCCGAACATGCATCAGGCGTGGCAGGCGG
 AlaPheThrThrLeuValGlnGlySerLeuProGluLeuHisGlnAlaTrpGlnAlaVal

2761 TGGACGAGCGTCCGCATGCTAATCGCTTTTTACCGCCAGATGAAATCGAACAGTGCCTGA
 AspGluArgProHisAlaAsnArgPheLeuProProAspGluIleGluGlnSerLeuAsn SphI

2821 ACGGCGTGCATTATCAACATCATATTACGCCATCACGCTGTGGTTTGATGATGCGCTCA
 GlyValHisTyrGlnHisHisIleGlnProIleThrLeuTrpPheAspAspAlaLeuSer

2881 GTGCCATGCGTTTCGCTGAAAGGCATCGGTGCCACGCATCTTCATGAAGGGCGCGACCCGC
 AlaMETArgSerLeuLysGlyIleGlyAlaThrHisLeuHisGluGlyArgAspProArg BspHI

2941 GAATATTAACGCGTTTCGAGTTGCAGCGATTGCAACTGGCCTGGCCGCAACAGCAGGGGC
 IleLeuThrArgSerGlnLeuGlnArgLeuGlnLeuAlaTrpProGlnGlnGlnGlyArg SspI MluI

3001 GATATCCTCTGACGTATCATCTTTTTTTGGGAGTGATTGCTCGTGAGTAAACGTTATTTT
 TyrProLeuThrTyrHisLeuPheLeuGlyValIleAlaArgGlu*** EcoRV bioD15
 SD xMETSerLysArgTyrPhe

3061 GTCACCGGAACGGATACCGAAGTGGGGAAAACGTGCGCCAGTTGTGCACTTTTACAAGCC
 ValThrGlyThrAspThrGluValGlyLysThrValAlaSerCysAlaLeuLeuGlnAla SnoI

3121 GCAAAGGCAGCAGGCTACCGGACGGCAGGTTATAAACGGTTCGCCTCTGGCAGCGAAAAG
 AlaLysAlaAlaGlyTyrArgThrAlaGlyTyrLysProValAlaSerGlySerGluLys

3181 ACCCCGGAAGGTTTACGCAATAGCGACGCGCTGGCGTTACAGCGCAACAGCAGCCTGCAG
 ThrProGluGlyLeuArgAsnSerAspAlaLeuAlaLeuGlnArgAsnSerSerLeuGln PstI

3241 CTGGATTACGCAACAGTAAATCCTTACACCTTCGCAGAACCCACTTCGCCGCACATCATC
 LeuAspTyrAlaThrValAsnProTyrThrPheAlaGluProThrSerProHisIleIle PvuII

ERSATZBLATT

12/15

Fig. 6E

3301 BssHII AGCGCGCAAGAGGGCAGACCGATAGAATCATTGGTAATGAGCGCCGGATTACBssHII CGCGCGCTT
 SerAlaGlnGluGlyArgProIleGluSerLeuValMETSerAlaGlyLeuArgAlaLeu

3361 GAACAACAGGCTGACTGGGTGTTAGTGGAAGGTGCTGGCGGCTGGTTTACGCCGCTTTCT
 GluGlnGlnAlaAspTrpValLeuValGluGlyAlaGlyGlyTrpPheThrProLeuSer

3421 GACACTTTCACCTTTTGCAGATTGGGTAACACAGGAACAACCTGCCGGTGATACTGGTAGTT
 AspThrPheThrPheAlaAspTrpValThrGlnGluGlnLeuProValIleLeuValVal

3481 GGTGTGAAACTCGGCTGTATTAATCACGCGATGTTGACTGCACAGGTAATACAACACGCC
HindII
 GlyValLysLeuGlyCysIleAsnHisAlaMETLeuThrAlaGlnValIleGlnHisAla

3541 GGACTGACTCTGGCGGGTGGGTGGCGAACGATGTTACGCCTCCGGGAAAACGTCACGCT
 GlyLeuThrLeuAlaGlyTrpValAlaAsnAspValThrProProGlyLysArgHisAla

3601 GAATATATGACCACGCTCACCCGCATGATTCCCGCGCCGCTGCTGGGAGAGATCCCCTGG
 GluTyrMETThrThrLeuThrArgMETIleProAlaProLeuLeuGlyGluIleProTrp

3661 CTTGCAGAAAATCCAGAAAATGCGGCAACCGGAAAGTACATAAACCTTGCCCTTCGTCGAC
HindII SalI
 LeuAlaGluAsnProGluAsnAlaAlaThrGlyLysTyrIleAsnLeuAlaPheValAsp

3721 MluI SalI bioA
 GCGTCGACTCTAGGGTTTACAAGTCGATTATGACAACGGACGATCTTGCCCTTTGACCAAC
SD METThrThrAspAspLeuAlaPheAspGlnArg
 AlaSerThrLeuGlyPheThrSerArgLeu***

3781 GCCATATCTGGCACCCATACACATCCATGACCTCCCCTCTGCCGGTTTATCCGGTGGTGA
 HisIleTrpHisProTyrThrSerMETThrSerProLeuProValTyrProValValSer

3841 GCGCCGAAGGTTGCGAGCTGATTTTGTCTGACGGCAGACGCTGGTTGACGGTATGTCGT
HindII
 AlaGluGlyCysGluLeuIleLeuSerAspGlyArgArgLeuValAspGlyMETSerSer

3901 CCTGGTGGGCGGCGATCCACGGCTACAATCACCCGAGCTTAATGCGGCGATGAAGTCGC
 TrpTrpAlaAlaIleHisGlyTyrAsnHisProGlnLeuAsnAlaAlaMETLysSerGln

3961 AAATTGATGCCATGTGCGCATGTGATGTTTGGCGGTATCACCCATGCGCCAGCCATTGAGC
 IleAspAlaMETSerHisValMETPheGlyGlyIleThrHisAlaProAlaIleGluLeu

4021 TGTGCCGCAAACTGGTGGCGATGACGCCGCAACCGCTGGAGTGCGTTTCTCGCGGACT
 CysArgLysLeuValAlaMETThrProGlnProLeuGluCysValPheLeuAlaAspSer

4081 CCGGTTCCGTAGCGGTGGAAGTGGCGATGAAAATGGCGTTGCAGTACTGGCAAGCCAAAG
ScaI
 GlySerValAlaValGluValAlaMETLysMETAlaLeuGlnTyrTrpGlnAlaLysGly

ERSATZBLATT

13/15

Fig. 6F

4141 BssHII
GCGAAGCGCGCCAGCGTTTTCTGACCTTCCGCAATGGTTATCATGGCGATACCTTTGGCG
GluAlaArgGlnArgPheLeuThrPheArgAsnGlyTyrHisGlyAspThrPheGlyAla

4201 CGATGTCGGTGTGCGATCCGGATAACTCAATGCACAGTCTGTGGAAAGGCTACCTGCCAG
METSerValCysAspProAspAsnSerMETHisSerLeuTrpLysGlyTyrLeuProGlu

4261 AAAACCTGTTTGCTCCCGCCCCGCAAAGCCGCATGGATGGCGAATGGGATGAGCGCGATA
AsnLeuPheAlaProAlaProGlnSerArgMETAspGlyGluTrpAspGluArgAspMET

4321 BspHI
TGGTGGGCTTTGCCCGCCTGATGGCGGCGCATCGTCATGAAATCGCGGCGGTGATCATTG
ValGlyPheAlaArgLeuMETAlaAlaHisArgHisGluIleAlaAlaValIleIleGlu

4381 FspI
AGCCGATTGTCCAGGGCGCAGGCGGGATGCGCATGTACCATCCGGAATGGTTAAAACGAA
ProIleValGlnGlyAlaGlyGlyMETArgMETTyrHisProGluTrpLeuLysArgIle

4441 PvuI NruI
TCCGCAAAATATGCGATCGCGAAGGTATCTTGCTGATTGCCGACGAGATCGCCACTGGAT
ArgLysIleCysAspArgGluGlyIleLeuLeuIleAlaAspGluIleAlaThrGlyPhe

4501 TTGGTCGTACCGGGAAACTGTTTGCCTGTGAACATGCAGAAATCGCGCCGGACATTTTGT
GlyArgThrGlyLysLeuPheAlaCysGluHisAlaGluIleAlaProAspIleLeuCys

4561 GCCTCGGTAAAGCCTTAACCGGCGGCACAATGACCCTTCCGCCACACTCACCACGCGCG
LeuGlyLysAlaLeuThrGlyGlyThrMETThrLeuSerAlaThrLeuThrThrArgGlu

4621 NsiI
AGGTGTCAGAAACCATCAGTAACGGTGAAGCCGGTTGCTTTATGCATGGGCCAACTTTTA
ValAlaGluThrIleSerAsnGlyGluAlaGlyCysPheMETHisGlyProThrPheMET

4681 TGGGCAATCCGCTGGCCTGCGCGGCAGCAAACGCCAGCCTGGCGATTCTCGAATCTGGCG
GlyAsnProLeuAlaCysAlaAlaAlaAsnAlaSerLeuAlaIleLeuGluSerGlyAsp

4741 PvuII
ACTGGCAGCAACAGGTGGCGGATATTGAAGTACAGCTGCGCGAGCAACTTGCCCCGCCCC
TrpGlnGlnGlnValAlaAspIleGluValGlnLeuArgGluGlnLeuAlaProAlaArg

4801 GTGATGCCGAAATGGTTGCCGATGTGCGCGTACTGGGGGCCATTGGCGTGGTCGAAACCA
AspAlaGluMETValAlaAspValArgValLeuGlyAlaIleGlyValValGluThrThr

4861 BamHI
CTCATCCGGTGAATATGGCGGCGCTGCAAAAATCTTTGTGCAACAGGGTGTCTGGATCC
HisProValAsnMETAlaAlaLeuGlnLysPhePheValGluGlnGlyValTrpIleArg

4921 GGCTTTTGGCAAACTGATTTACCTGATGCCGCCCTATATTATTCTCCCGCAACAGTTGC
ProPheGlyLysLeuIleTyrLeuMETProProTyrIleIleLeuProGlnGlnLeuGln

ERSATZBLATT

14/15

Fig. 6G

Fig. 6C

4981 AGCGTCTGACCGCAGCGGTTAACCGCGCGGTACAGGATGAAACATTTTTTTGCCAATAAC
ArgLeuThrAlaAlaValAsnArgAlaValGlnAspGluThrPhePheCysGln*

5041 GAGAAGTCCGCGTGAGGGTTTCTGGCTACACTTTCTGCAAACAAGAAAGGAGGGTTCATG
SD MET

5101 AAACCTCATCAGTAACGATCTGCGCGATGGCGATAAATTGCCGCATCGTCATGTCTTTAAC
LysLeuIleSerAsnAspLeuArgAspGlyAspLysLeuProHisArgHisValPheAsn

5161 GGCATGGGTTACGATGGCGATAATATTTACCCGCATCTGGCGTGGGATGATGTTCTCTGCG
GlyMETGlyTyrAspGlyAspAsnIleSerProHisLeuAlaTrpAspAspValProAla

5221 GGAACGAAAAGTTTTGTTGTACCTGCTACGACCCGGATGCGCCAACCGGCTCCGGCTGG
GlyThrLysSerPheValValThrCysTyrAspProAspAlaProThrGlySerGlyTrp

5281 TGGCACTGGGTAGTTGTTAACTTACCCGCTGATACCCGCGTATTACCGCAAGGGTTTGGC
TrpHisTrpValValValAsnLeuProAlaAspThrArgValLeuProGlnGlyPheGly

5341 TCTGGTCTGGTAGCAATGCCAGACGGCGTTTTTGACAGACGCGTACCGACTTTGGTAAAACC
SerGlyLeuValAlaMETProAspGlyValLeuGlnThrArgThrAspPheGlyLysThr

5401 GGGTACGATGGCGCAGCACCGCCGAAAGGCGAACTCATCGCTACATTTTTTACCGTTCAC
GlyTyrAspGlyAlaAlaProProLysGlyGluThrHisArgTyrIlePheThrValHis

5461 GCGCTGGATATAGAACGTATTGATGTCGATGAAGGTGCCAGCGGCGCGATGGTCGGGTTT
AlaLeuAspIleGluArgIleAspValAspGluGlyAlaSerGlyAlaMETValGlyPhe

5521 AACGTTCAATTTCCACTCTCTGGCAAGCGCCTCGATTACTGCGATGTTTAGTTAATCACTC
AsnValHisPheHisSerLeuAlaSerAlaSerIleThrAlaMETPheSer***

5581 TGCCAGATGGCGCAATGCCATCTGGTATCACTTAAAGGTATTAAAAACAACCTTTTTGTCT

5641 TTTTACCTTCCCGTTTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCTTCAACGGATTCAATTTT

5701 TCTATTTTCATAGCCCGGAGCAACCTGTGAACACATTTTCAGTTTCCCGTCTGGCGCTGGC

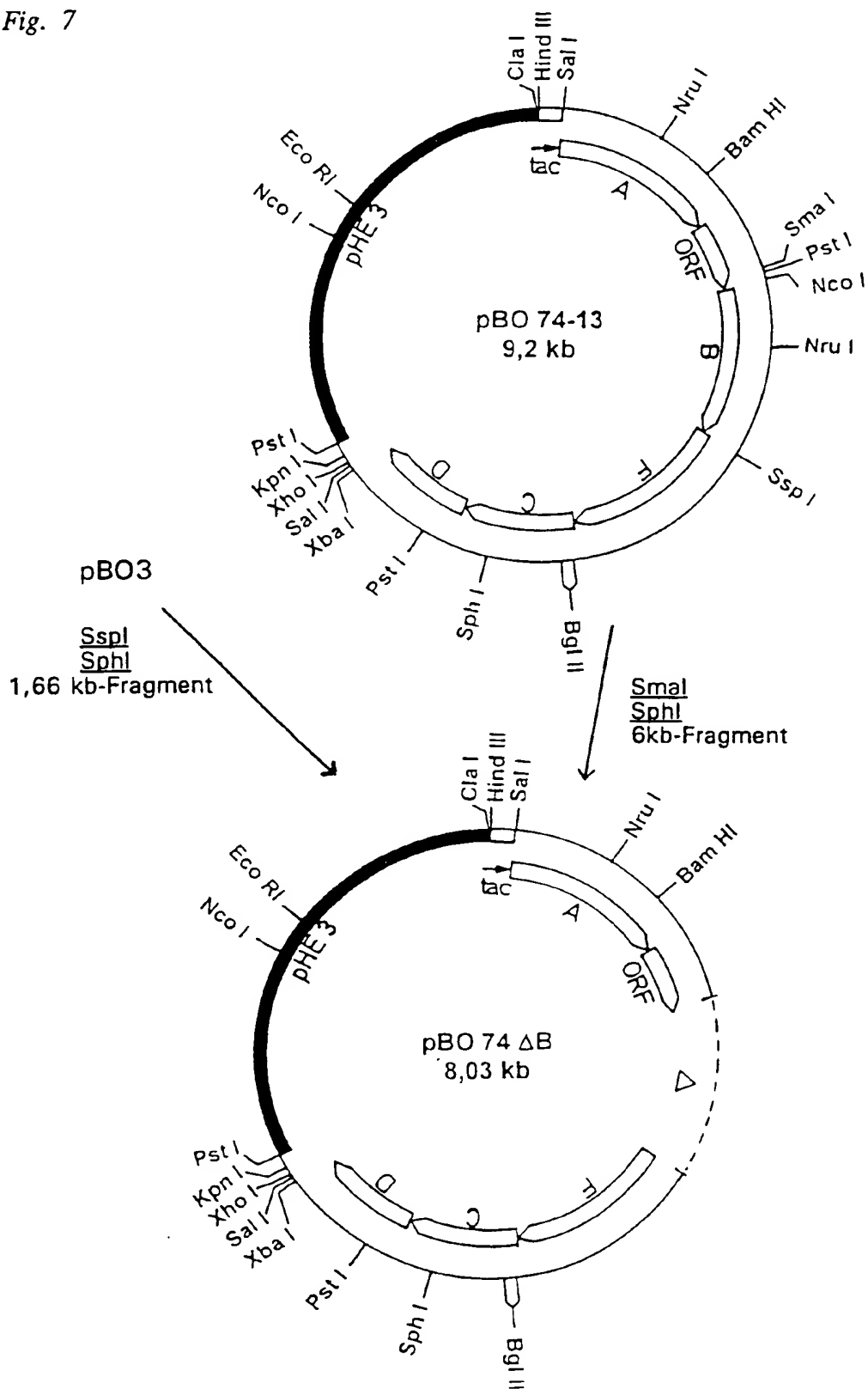
5761 ATTGGCTTTTGGCGTGACGCTGACCGCCTGTAGCTCAACCCCGCCCGATCAACGTCCTTC

5821 TGATCAAACCGCGCCTGGTACCGAGCTCGAATTCCTGCAGGCATGCAAGCTT-3'

ERSATZBLATT

15/15

Fig. 7



ERSATZBLATT

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/67, 15/52, 15/70, 1/21 C12P 17/18 // (C12N 1/21 C12R1:19, 1:01)</p>	<p>A3</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/08023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. April 1994 (14.04.94)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02688 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Oktober 1993 (01.10.93) (30) Prioritätsdaten: 3124/92 2. Oktober 1992 (02.10.92) CH 2134/93 15. Juli 1993 (15.07.93) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; Gampel/Wallis, Münchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BIRCH, Olwen [GB/CH]; Dammweg 11D, CH-3904 Naters (CH). BRASS, Johann [DE/CH]; In den Schatmatten, CH-3938 Ausserberg (CH). FUHRMANN, Martin [DE/CH]; Litternaweg 9, CH-3930 Visp (CH). SHAW, Nicholas [GB/CH]; Weingartenweg 14, CH-3930 Visp (CH).</p>	<p>(74) Anwälte: WEINHOLD, Peter; Siegfriedstrasse 8, D-80803 München (DE) usw. (81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 23. Juni 1994 (23.06.94)</p>	

(54) Title: BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF PRODUCING BIOTIN

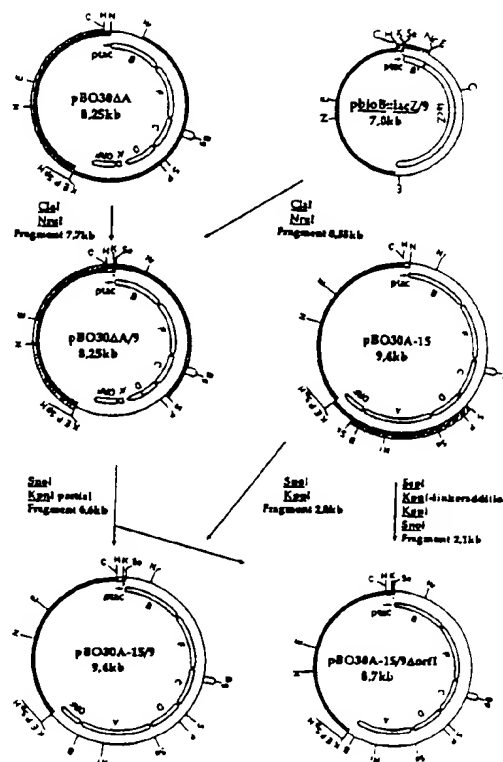
(54) Bezeichnung: BIOTECHNOLOGISCHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN

(57) Abstract

The invention pertains to DNA fragments and plasmids comprising the *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* and *bioA* genes responsible for biosynthesis of biotin, or their functionally equivalent genetic variants and mutants from enteric bacteria, wherein the genes are arranged in a transcription unit. The invention also pertains to microorganisms that contain these DNA fragments and plasmids and a method of producing biotin using these microorganisms.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft DNA-Fragmente und Plasmide, umfassend die Gene der Biotin-Biosynthese *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD* und *bioA* oder deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten aus Enterobakterien, worin die Gene in einer Transkriptionseinheit angeordnet sind. Die Erfindung betrifft ferner Mikroorganismen, die diese DNA-Fragmente und Plasmide enthalten, und ein Verfahren zur Herstellung von Biotin unter Verwendung dieser Mikroorganismen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakeien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/02688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/67 C12N15/52 C12N15/70 C12N1/21 C12P17/18
 //(C12N1/21, C12R1:19, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB, A, 2 216 530 (THE MINISTER FOR AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD) 11 October 1989	1-4
Y	see page 7, line 26 - line 30 see page 8, line 17 - line 20 see page 8, line 21 - line 28 see page 18, line 17 - line 19 see claim 17 ---	5-7, 10, 13, 16
Y	AGRIC. BIOL. CHEM. vol. 50, no. 2, 1986, TOKYO, JAPAN; pages 499 - 500 Y. KAWAGUCHI ET AL. 'Improved direct expression of Prochymosin cDNA through changing the SD-ATG codon length' see page 499, left column, line 1 - page 500, right column, line 3 --- -/-	5-7, 10, 13, 16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "B" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 1994

Date of mailing of the international search report

20. 05. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/02688

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DNA vol. 2, no. 3, 1983, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS; pages 231 - 235 H.A. DE BOER ET AL. 'Portable shine-dalgarno regions: A system study of defined alterations of the nucleotide sequences within E. coli ribosome binding sites' see page 231, left column, line 1 - right column, line 2 see page 234, left column, line 1 - right column, line 18; table 2 ---	5-7,10, 13,16
Y	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY vol. 9, 1989, ELSEVIER, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS; pages 179 - 190 M.K.OLSEN ET AL. 'Enhancement of heterologous polypeptide expression by alterations in the ribosome-binding-site sequence' see page 186, paragraph 2 - page 188, paragraph 4 ---	5-7,10, 13,16
A	GENE vol. 67, no. 2, 1988, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; pages 203 - 211 D. SHIUAN AND A. CAMPBELL 'Transcriptional regulation and gene arrangement of Escherichia coli, Citrobacter freundii and Salmonella typhimurium biotin operons' cited in the application see page 203, line 1 - line 9; figure 3 ---	1-23
A	WO,A,87 01391 (AMGEN) 12 March 1987 cited in the application see page 2, line 20 - page 3, line 3 ---	1-23
A	EP,A,0 266 240 (TRANSGENE S.A.) 4 May 1988 cited in the application see page 2, line 1 - page 6, line 29 ---	1-23
A	EP,A,0 449 724 (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 2 October 1991 cited in the application see page 3, line 7 - page 4, line 56 ---	1-23
A	EP,A,0 316 229 (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 17 May 1989 cited in the application see page 2, line 46 - page 3, line 7 ---	1-23
	--- -/--	

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 93/02688

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BIOSCI. BIOTECH. BIOCHEM. vol. 56, no. 11, November 1992, TOKYO,JP; pages 1780 - 1785 O. IFUKU ET AL. 'Conversion of dethiobiotin to biotin in cell-free extracts of Escherichia coli' see the whole document ---	20,21
T	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS vol. 110, no. 1, 1 June 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL; pages 1 - 4 A. FUJISAWA ET AL. 'Bioconversion of dethiobiotin to biotin by a cell-free system of a bioYB transformant of Bacillus shaericus' see the whole document -----	17-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/02688

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.- Claims 1-16
- 2.- Claims 17-23

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/02688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2216530	11-10-89	NONE	
WO-A-8701391	12-03-87	AU-B- 599046	12-07-90
		AU-A- 6229786	24-03-87
		CA-A- 1317245	04-05-93
		DE-A- 3688248	13-05-93
		EP-A, B 0236429	16-09-87
		JP-T- 1500081	19-01-89
		US-A- 5110731	05-05-92
EP-A-0266240	04-05-88	FR-A- 2604436	01-04-88
		FR-A- 2615514	25-11-88
		AU-B- 616380	31-10-91
		AU-A- 7890887	19-05-88
		CN-A- 1031111	15-02-89
		JP-A- 63173591	18-07-88
		US-A- 5096823	17-03-92
EP-A-0449724	02-10-91	JP-A- 3277269	09-12-91
		AU-A- 7372491	31-10-91
		CN-A- 1066291	18-11-92
		US-A- 5179011	12-01-93
EP-A-0316229	17-05-89	AU-B- 602274	04-10-90
		AU-A- 2614688	01-06-89
		WO-A- 8904365	18-05-89
		JP-T- 2502065	12-07-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02688

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 C12N15/67 C12N15/52 C12N15/70 C12N1/21 C12P17/18
 //(C12N1/21,C12R1:19,C12R1:01)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB,A,2 216 530 (THE MINISTER FOR AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD) 11. Oktober 1989	1-4
Y	siehe Seite 7, Zeile 26 - Zeile 30	5-7, 10, 13, 16
	siehe Seite 8, Zeile 17 - Zeile 20 siehe Seite 8, Zeile 21 - Zeile 28 siehe Seite 18, Zeile 17 - Zeile 19 siehe Anspruch 17	

Y	AGRIC. BIOL. CHEM. Bd. 50, Nr. 2, 1986, TOKYO, JAPAN; Seiten 499 - 500 Y. KAWAGUCHI ET AL. 'Improved direct expression of Prochymosin cDNA through changing the SD-ATG codon length' siehe Seite 499, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 500, rechte Spalte, Zeile 3	5-7, 10, 13, 16

	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. April 1994

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20. 05. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2230 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DNA Bd. 2, Nr. 3, 1983, MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS; Seiten 231 - 235 H.A. DE BOER ET AL. 'Portable shine-dalgarno regions: A system study of defined alterations of the nucleotide sequences within E. coli ribosome binding sites' siehe Seite 231, linke Spalte, Zeile 1 - rechte Spalte, Zeile 2 siehe Seite 234, linke Spalte, Zeile 1 - rechte Spalte, Zeile 18; Tabelle 2 ---	5-7, 10, 13, 16
Y	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY Bd. 9, 1989, ELSEVIER, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS; Seiten 179 - 190 M.K. OLSEN ET AL. 'Enhancement of heterologous polypeptide expression by alterations in the ribosome-binding-site sequence' siehe Seite 186, Absatz 2 - Seite 188, Absatz 4 ---	5-7, 10, 13, 16
A	GENE Bd. 67, Nr. 2, 1988, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 203 - 211 D. SHIUAN AND A. CAMPBELL 'Transcriptional regulation and gene arrangement of Escherichia coli, Citrobacter freundii and Salmonella typhimurium biotin operons' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 203, Zeile 1 - Zeile 9; Abbildung 3 ---	1-23
A	WO, A, 87 01391 (AMGEN) 12. März 1987 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Zeile 20 - Seite 3, Zeile 3 ---	1-23
A	EP, A, 0 266 240 (TRANSGENE S.A.) 4. Mai 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Zeile 1 - Seite 6, Zeile 29 ---	1-23
A	EP, A, 0 449 724 (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 2. Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 7 - Seite 4, Zeile 56 ---	1-23
A	EP, A, 0 316 229 (SHISEIDO COMPANY LIMITED) 17. Mai 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Zeile 46 - Seite 3, Zeile 7 ---	1-23

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>BIOSCI. BIOTECH. BIOCHEM. Bd. 56, Nr. 11, November 1992, TOKYO,JP; Seiten 1780 - 1785 O. IFUKU ET AL. 'Conversion of dethiobiotin to biotin in cell-free extracts of Escherichia coli' insgesamt</p> <p style="text-align: center;">---</p>	20,21
T	<p>FEMS MICROBIOLOGY LETTERS Bd. 110, Nr. 1, 1. Juni 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL; Seiten 1 - 4 A. FUJISAWA ET AL. 'Bioconversion of dethiobiotin to biotin by a cell-free system of a bioYB transformant of Bacillus shaericus' insgesamt</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	17-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/ 02688

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

- 1.- Ansprüche 1-16
- 2.- Ansprüche 17-23

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02688

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB-A-2216530	11-10-89	KEINE	
WO-A-8701391	12-03-87	AU-B- 599046	12-07-90
		AU-A- 6229786	24-03-87
		CA-A- 1317245	04-05-93
		DE-A- 3688248	13-05-93
		EP-A, B 0236429	16-09-87
		JP-T- 1500081	19-01-89
		US-A- 5110731	05-05-92
EP-A-0266240	04-05-88	FR-A- 2604436	01-04-88
		FR-A- 2615514	25-11-88
		AU-B- 616380	31-10-91
		AU-A- 7890887	19-05-88
		CN-A- 1031111	15-02-89
		JP-A- 63173591	18-07-88
		US-A- 5096823	17-03-92
EP-A-0449724	02-10-91	JP-A- 3277269	09-12-91
		AU-A- 7372491	31-10-91
		CN-A- 1066291	18-11-92
		US-A- 5179011	12-01-93
EP-A-0316229	17-05-89	AU-B- 602274	04-10-90
		AU-A- 2614688	01-06-89
		WO-A- 8904365	18-05-89
		JP-T- 2502065	12-07-90